

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月22日 (22.03.2001)

PCT

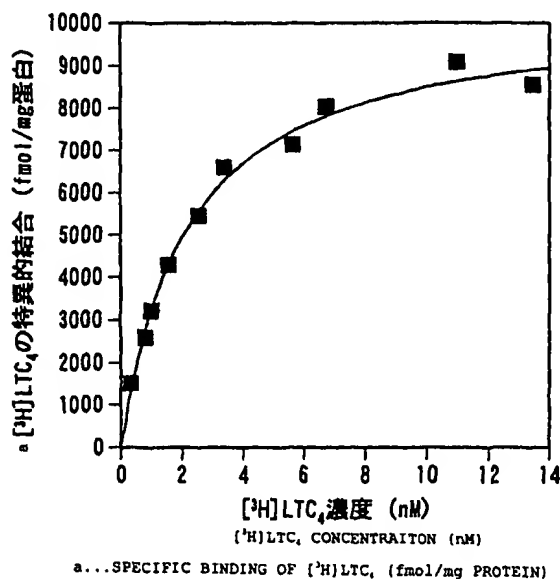
(10) 国際公開番号
WO 01/19986 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/02, A61K 31/422, A61P 43/00, 9/08, C07D 413/12
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06265
- (22) 国際出願日: 2000年9月13日 (13.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/259986 1999年9月14日 (14.09.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号 Tokyo (JP). 株式会社ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高崎 淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP]. 蒲原正純 (KAMOHARA, Masazumi) [JP/JP]. 松本光之 (MATSUMOTO, Mitsuyuki) [JP/JP]. 齋藤 哲 (SAITO, Tetsu) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 杉本 貴 (SUGIMOTO, Tohru) [JP/JP]; 〒174-8612 東京都板橋区蓮根3-17-1 山之内

[続葉有]

(54) Title: PEPTIDE LEUKOTRIENE RECEPTOR

(54) 発明の名称: ペプチドロイコトリエン受容体



(57) Abstract: A cDNA encoding a novel LTC₄ receptor is isolated. Provision of the LTC₄ receptor which is a novel protein, enables binding experiments with the use of LTC₄. By screening a compound modifying the activity of the LTC₄ receptor on the basis of these binding experiments, it becomes possible to develop drugs targeting the LTC₄ receptor.

(57) 要約:

新規 LTC₄ 受容体タンパク質をコードする cDNA を単離した。新規タンパク質である LTC₄ 受容体の提供により、LTC₄ を用いた結合実験が可能となった。結合実験に基づく LTC₄ 受容体の活性を修飾する化合物のスクリーニングによって、LTC₄ 受容体を標的とする医薬開発が可能となる。

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/19986 A1



製薬株式会社内 Tokyo (JP). 太田紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao) [JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稲敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒173-0013 東京都板橋区氷川町27-3-403 Tokyo (JP). 河合弓利 (KAWAI, Yuri) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-201 Chiba (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,

MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

ペプチドロイコトリエン受容体

技術分野

本発明は、新規なペプチドロイコトリエン受容体タンパク質、この新規なタンパク質をコードしている DNA、該 DNA を含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞及び該細胞を使用した薬物スクリーニング法に関する。

背景技術

プロスタグランジンやトロンボキサン、ロイコトリエンのようなエイコサノイドはアラキドン酸の代謝産物の一つのファミリーであり、生体のホメオスタシスを維持するために様々な生理作用を発揮している（講座プロスタグランジン 1～8、鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編（1988）参照）。それらの生理作用はそれぞれのエイコサノイドに特有の細胞膜受容体を介して発現すると考えられている。エイコサノイドの一つであるロイコトリエンは、アラキドン酸の 5-リボキシゲナーゼ系の代謝産物の中で低濃度で強い生理活性を示す一連の生理活性脂質である（Samuelsson, B. et al. (1987) Science. 237, 1171-1176）。

ロイコトリエン類はロイコトリエン B₄ (LTB₄) と、脂肪酸にペプチドが結合したペプチドロイコトリエンの二つに大別される。後者のペプチドロイコトリエンとしては、ロイコトリエン C₄ (LTC₄)、ロイコトリエン D₄ (LTD₄)、およびロイコトリエン E₄ (LTE₄) が知られている。LTB₄ は白血球の強力な活性化因子であり、炎症免疫反応や感染防御などで重要な役割を果たしている（Chen, X. S. et al. (1994) Nature 372. p179-182）。一方、LTC₄、LTD₄、および LTE₄ は、気道平滑筋をはじめとする種々の平滑筋の収縮、気道の粘膜分泌亢進、細動静脈の収縮、血清成分の漏出などの作用を持っている（Taylor, G. W. et al. (1986) Trends

Pharmacol. Sci. 7, p100-103)。このような作用から、ペプチドロイコトリエンは、炎症やアレルギー性症状、例えば喘息や気管支炎やアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患、乾せんや皮膚炎などの皮膚疾患、inflammatory bowel disease や潰瘍性大腸炎などの腸疾患、の発症、進展、増悪に関与していると考えられている（鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編（1988）講座プロスタグランジン 3, 225-227, 484-486, Piper, P. J. et al. (1984) *Physiol. Rev.* 64. 744-761, Taylor, G. W. et al. (1986) *Trends Pharmacol. Sci.* 7. 100-103, Lewis, R. A. et al. (1990) *N. Engl. J. Med.* 323. 654-655)。また、ペプチドロイコトリエン (LTC_4 および LTD_4) は心収縮力や冠血流量の著名な低下をもたらすことが知られており（鹿取信、室田誠逸、山本尚三 編（1988）講座プロスタグランジン 2, 64-70, Piper, P. J. et al. (1984) *Physiol. Rev.* 64. 744-761, Letts, L.G. et al., (1982) *Br. J. Pharmacol.* 76, 169-176, Chiono, M. et al., (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 1042-1048)、心臓血管障害との関連が指摘されている。

以上のことから、ロイコトリエン類の受容体の構造および性質を明らかにすることはロイコトリエン類の生理的役割の解明、引いては、ロイコトリエン類の関与する疾患の解明、治療法の発見等につながるものと考えられる。

現在までに、IUPHAR (International union of Pharmacology) によって、ロイコトリエンの受容体は薬理学的に BLT 受容体、CysLT1 受容体、および CysLT2 受容体の 3 つに分類されている (Alexander, S. P. H. et al. (1997) *Trends Pharmacol. Sci. (Suppl.)* 50-51)。

BLT 受容体は、 LTB_4 を特異的に認識する受容体である。CysLT1 受容体と CysLT2 受容体は、いずれもペプチドロイコトリエンを認識する受容体である。CysLT1 受容体が、既存の古典的 LTD_4 受容体拮抗薬 (ICI204219、MK476、SR2640、SKF104353、LY170680 等) でその生物作用が遮断されるのに対して、CysLT2 受容体は遮断されない。その他、CysLT1 受容体や CysLT2 受容体とは異なるペプチドロイコトリエン受容体の存在を示唆する報告も有る (Jonsson, E. W. et al. (1998) *Eur. J.*

Pharmacol. 357, 203-211)。

ロイコトリエン受容体遺伝子としては、BLT 受容体がヒト (Yokomizo, T. et al (1997) Nature 387, 620-624)、マウス(Martin, V. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 8597-8603)で単離同定されている。また、最近、CysLT1 受容体がヒトで単離同定され、LTD₄が親和性の高いリガンドであることが判明した。(Lynch, K. R. et al. (1999) Nature 399, 789-793)。しかしながら現時点では、CysLT1 受容体以外のペプチドロイコトリエンの受容体、とくに、LTC₄に親和性の高い受容体の遺伝子は如何なる種においても単離同定されていない。

さらには、これまで、抗炎症薬を目指して BLT 受容体の拮抗薬 (Negro, J. M. et al. (1997) Allergol. Immunopathol. Madr. 25, 104-112, Kishikawa, K. et al. (1995) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 23, 279-281) や CysLT1 受容体の拮抗薬 (Leff, J. A. et al. (1998) N. Engl. J. Med. 339, 147-152, Suisa, S. et al. (1997) Ann. Int. Med. 126, 177-183, Grossman, J. et al. (1997) J. Asthma 34, 321-328) が研究開発されている。

一方、ロイコトリエン受容体のなかでも特に LTC₄に親和性の高い受容体については、拮抗薬、作動薬の研究開発は進んでいない (Gardiner, P. J. et al. (1994) Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 22, 49-61, Capra, V. et al. (1998) Mol. Pharmacol. 53, 750-758)。LTC₄と受容体との結合が、Glutathione S-transferase や LTC₄ Synthase のような細胞や組織が持つ親和性の低い LTC₄ 結合タンパク質にマスクされてしまうため、細胞や組織標本を用いた結合実験が困難なことが主な原因である。したがって、インビトロでの結合実験を可能とする LTC₄ 受容体の提供が望まれている。

発明の開示

本発明の課題は、ヒトの LTC₄ 受容体または該受容体と同等の機能を有するタンパク質と、それをコードする遺伝子の提供である。また本発明は、LTC₄ 受容体タ

- 4 -

ンパク質を使用したペプチドロイコトリエン受容体を標的とする薬物として有用な化合物のスクリーニング法の提供をも課題としている。

本発明者らは、LTC₄ 受容体をコードする DNA の単離のために、ヒト全長 cDNA ライブラリーの利用が有効なのではないかと考えた。LTC₄ 受容体タンパク質の単離が望まれながら、これまで達成できていないことから、まったく新しいアプローチを試みることに意義がある。特に、タンパク質コード領域を確実に含む全長 cDNA ライブラリーを用いることにより、未知のタンパク質の単離を迅速に達成できると考えた。翻訳開始コドン具备了全長 cDNA を細胞に導入すれば、容易にタンパク質の機能を確認できるためである。

本発明者らは、まずオリゴキャップ法 [K. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994); Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)] によって全長率の高いヒト cDNA ライブラリーを合成した。次いでこの cDNA ライブラリーから単離したクローンから、ヒト全長 cDNA をクローニングした。更にこうして得られた全長 cDNA クローンの中から、膜受容体をコードすると推定される cDNA を選択するために、シグナル配列、あるいは膜貫通領域を含むアミノ酸配列をコードする cDNA クローンを選択した。こうして絞り込まれた cDNA クローンの中に、COS 細胞に形質転換することによってロイコトリエン C 4 (LTC₄) 受容体活性を有するタンパク質をコードする cDNA を確認した。更に、この cDNA によってコードされるタンパク質を用いて LTC₄ 受容体の活性を修飾する化合物のスクリーニングが可能となることを見出した。更に、この cDNA のブタとラットにおけるホモログを単離し、それらがいずれも LTC₄ 受容体活性を有するタンパク質をコードしていることを明らかにした。また本発明の受容体は LTC₄ 受容体活性のみならず、LTD₄ 受容体活性をも併せ持つことを明らかにし、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のタンパク質、このタンパク質をコードする DNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕 配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載

- 5 -

のアミノ酸配列、または配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質。

〔2〕 配列番号：1、配列番号：17、および配列番号：21のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ロイコトリエンC₄受容体活性を有するタンパク質。

〔3〕 〔1〕、または〔2〕に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕 〔3〕に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

〔5〕 〔4〕に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質を製造する方法。

〔6〕 〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質に対する抗体。

〔7〕 次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエンC₄受容体活性を修飾する活性の検出方法。

a) ロイコトリエンC₄受容体のリガンドの存在下で〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b) ロイコトリエンC₄受容体活性の変化を測定する工程

〔8〕 次の工程を含むロイコトリエンC₄受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。

a) ロイコトリエンC₄受容体のリガンドの存在下で〔1〕または〔2〕に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、

b) ロイコトリエンC₄受容体活性の変化を測定する工程

c) ロイコトリエンC₄受容体活性を修飾する物質を選択する工程

- 6 -

〔 9 〕 〔 1 〕、または〔 2 〕に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用、または抗アレルギー用医薬組成物。

〔 1 0 〕 〔 1 〕、または〔 2 〕に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む血管拡張用医薬組成物。

あるいは本発明は、〔 1 〕または〔 2 〕に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用医薬組成物、抗アレルギー用医薬組成物、あるいは血管拡張用医薬組成物の製造における使用に関する。

更に本発明は、〔 8 〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる、〔 1 〕または〔 2 〕に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストに関する。加えて本発明は、〔 8 〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、〔 1 〕または〔 2 〕に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストとしての使用に関する。

本発明は、LTC₄ 受容体タンパク質に関する。本発明のタンパク質は、全長 cDNA ライブラリーを構成する全長 cDNA のクローンから選択された cDNA によってコードされるタンパク質である。また本発明のタンパク質は、本発明において明らかにされたヒト全長 cDNA の塩基配列情報に基づいて単離された、ブタおよびラットにおけるホモログである。GenBank や SwissProt の検索結果によれば、配列番号： 1 に示す塩基配列（約 2.8kb）と、この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列（配列番号： 2 / 3 4 6 アミノ酸残基）は新規である。またこのタンパク質のブタおよびラットにおけるホモログとして単離されたタンパク質のアミノ酸配列、並びにそれをコードする塩基配列も新規である。ブタに由来するタンパク質のアミノ酸配列は配列番号： 1 8 に、またその cDNA の塩基配列を配列番号： 1 7 に示した。またラットに由来するタンパク質のアミノ酸配列は配列番号： 2

- 7 -

2に、またその cDNA の塩基配列を配列番号：19に示した。本発明の LTC₄ 受容体タンパク質を構成するアミノ酸配列は、公知のヒト CysLT1 受容体とは31%、ヒト BLT 受容体とは20%の相同性を有していた。一方、ブタとラットに由来するタンパク質とヒトのタンパク質を比較すると、次に示すような構造的な類似が見られた。

アミノ酸残基 ヒトとの相同性		
ヒト	346	—
ブタ	345	77.7%
ラット	309	72.6%

更にブタとラットに由来するタンパク質においても、本発明のタンパク質と同様に LTC₄ 受容体活性が確認された。これらの事実に基づいて、本発明において分離されたこれらのタンパク質は、いずれもヒト LTC₄ 受容体のホモログであると考えられた。本発明のタンパク質やその遺伝子、また、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物は、LTC₄ やその受容体が関与する疾患の予防や治療への応用が考えられる。

前述のとおり、LTC₄ および LTD₄ 等のペプチドロイコトリエン類は、喘息、気管支炎、あるいはアレルギー性鼻炎などの呼吸器疾患、乾せんや皮膚炎などの皮膚疾患、inflammatory bowel disease や潰瘍性大腸炎などの腸疾患、などの発症、進展、増悪に関与していると考えられている。また、ペプチドロイコトリエン(LTC₄ および LTD₄) は、心臓血管障害との関連も指摘されている。したがって、本発明によって提供される LTC₄ 受容体は、これらの疾患や症状において重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、その活性を修飾する化合物は、これらの疾患の治療および／または予防のための医薬品として有用である。たとえば LTC₄ 受容体と LTC₄ の結合に干渉し、LTC₄ 受容体に刺激を伝達しない化合物は、LTC₄ のアンタゴニスト（遮断薬）として作用する。このような化合物は、LTC₄ 受容体を介する疾患の治療や予防に有用である。また本発明の受容体は、LTD₄ 受容体活性

も有するため、本受容体のアンタゴニストは LTD₄ 受容体のアンタゴニストとしても作用する。したがって、前記の LTC₄ と LTD₄ の両者が関与する疾患の、より良い治療薬や予防薬となりうる。

本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明の DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。あるいはインビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M. C., Jackson, R. J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照）などによって、本発明のタンパク質を調製することも可能である。一方、天然のタンパク質は、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 16.1-16.19）。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

また本発明には、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質のみならず、1 もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる、またはこれらを含むタンパク質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が配列番号：2 からなるタンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。配列番号：2 からなるタンパク質が持つ生物学的特性とは、LTC₄ の受容体として機能することに他ならない。本発明における LTC₄ 受容体活性とは、LTC₄ との結合親和性を備え、LTC₄ との結合によって LTC₄ 用量依存的に細胞内における Ca⁺⁺ 濃度の上昇をもたらすことと定義される。本発明における LTC₄ との結合

- 9 -

親和性とは、望ましくは解離定数 $K_d = 30 \text{ nM}$ 以下、より望ましくは $K_d = 5 \text{ nM}$ 以下の高い結合親和性を示す場合、そのタンパク質が LTC_4 との結合親和性を有すると言えることができる。

更に本発明のタンパク質と同等の生物学的特性を有するタンパク質は、望ましくは LTD_4 受容体活性を有する。 LTD_4 受容体活性とは、 LTD_4 との結合親和性を備え、 LTD_4 との結合によって LTD_4 用量依存的に細胞内における Ca^{++} 濃度の上昇をもたらすことと定義される。

タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内である。

本発明に基づいて、本発明のタンパク質の部分ペプチド断片を得ることができる。たとえば本発明のタンパク質の競合阻害剤として機能する、リガンドとの結合能を有する部分ペプチド断片が提供される。また、抗体調製のための抗原ペプチドを得ることもできる。部分ペプチド断片が本発明のタンパク質に特異的であるためには、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列から選択された連続する少なくとも 7 アミノ酸、好ましくは 8 アミノ酸以上、より好ましくは 9 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明の部分ペプチド断片は、本発明のタンパク質に対する抗体や本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明のタンパク質に結合するリガンドのスクリーニングなどに利用し得る。本発明の部分ペプチド断片は、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードする DNA に関する。本発明の DNA としては、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA など含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配

- 10 -

列を有する DNA が含まれる。このような塩基配列は、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定することができる(Crantham, R. et al.(1981) Nucleic Acids Res.,9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等にしがって改変することができる。

本発明の DNA は、配列番号：2 からなるタンパク質をコードする DNA 配列（配列番号：1）もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。たとえば本発明の LTC₄ 受容体タンパク質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織から抽出した mRNA を鋳型として cDNA を合成し、ベクターに組み込んで cDNA ライブラリーとする。本発明の LTC₄ 受容体の産生能力を有する細胞あるいは組織としては、例えばヒトの脾臓を用いることができる。このライブラリーを、配列番号：1 に基づいて設定したプローブを使ったコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることにより、目的とする cDNA のクローニングが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4) を用いて配列番号：2 からなるタンパク質をコードする塩基配列（配列番号：1）またはその一部をもとにこれと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を得ることは、通常行いうることである。このように得られた DNA は本発明に含まれる。

機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられる

が、これらに制限されない。

機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、通常、洗浄条件として「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される本発明の DNA がコードするタンパク質は、通常、配列番号：2 からなるタンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも 60% 以上、好ましくは 70% 以上の配列の同一性を指す。あるいは本発明における高い相同性とは、特に望ましくは 90% 以上、より望ましくは 95%、更に望ましくは 99% 以上の同一性を指す。相同性の特定は、BLAST 検索アルゴリズムを用いて決定することができる。

また、遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を用いて配列番号：2 からなるタンパク質をコードする DNA 配列（配列番号：1）の一部をもとにプライマーを設計し、配列番号：2 からなるタンパク質をコードする DNA 配列またはその一部と相同性の高い DNA 断片を単離することも可能である。

このようにして得られた、配列番号：1 の塩基配列と相同性の高い塩基配列からなる DNA によってコードされるタンパク質について、LTC₄ 受容体活性を確認し、最終的に本発明による DNA を単離することができる。LTC₄ 受容体活性は、cDNA を

動物細胞に形質転換してタンパク質に翻訳させ、これを LTC₄ 受容体に対する抗体や LTC₄ の結合を指標としてスクリーニングすることによって確認することができる。タンパク質の翻訳には、動物細胞のみならず、インビトロトランスレーションを利用することもできる。

本発明はこのようにして単離することができるタンパク質、並びにそれをコードする DNA を含む。すなわち本発明は、配列番号：17 に示す DNA と、それによってコードされるアミノ酸配列（配列番号：18）からなるブタ由来の LTC₄ 受容体を提供する。更に本発明は、配列番号：21 に示す DNA と、それによってコードされるアミノ酸配列（配列番号：22）からなるラット由来の LTC₄ 受容体を提供する。

その他、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられている（例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159 を参照）。この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。これら多型に基づいて塩基配列に変異を生じた DNA も、本発明の DNA に含まれる。

また、化学合成 DNA は、DNA 合成機（例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社) など）を用いて合成することができる。DNA の化学的な合成法は、たとえばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al.(1984) Nature, 10, 105-111)等として公知である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば 宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター(Stratagene 社製)などが好ましい。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用であ

る。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でタンパク質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター（プロメガ社製）、大腸菌であれば pET ベクター（Invitrogen 社製）などのベクターが知られている。脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトの elongation factor プロモーターを有する pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirus プロモーターを有する pCEP4 (Invitrogen 社) 等を示すことができる。また培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466~472(1988)) を用いることもできる。

ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

また、本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。タンパク質を高発現させるための真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、あるいは酵母等の細胞を利用することができる。具体的には、サル細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞および同細胞に Epstein Barr Virus の EBNA-1 遺伝子を導入した 293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社) 等が公知である。

宿主細胞として、COS 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40 複製起点を有し、COS 細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよび RNA スプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) *Med. Immunol.*, 20, 27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322)、pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature*, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターは DEAE-デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) *Virology*, 52, 456-457)、FuGENE6 (Boehringer Mannheim 社) を用いた方法、および電気バスル穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.*, 1, 841-845) 等により COS 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞として CHO 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418 耐性マーカーとして機能する neo 遺伝子を発現し得るベクター、例えば pRSVneo (Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) や pSV2-neo (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341) 等をコ・トランスフェクトし、G418 耐性のコロニーを選択することにより LTC₄ 受容体を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。あるいは宿主細胞として 293-EBNA 細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virus の複製起点を有し、293-EBNA 細胞で自己増殖が可能な pCEP4 (Invitrogen 社) などの発現ベクターを用いて目的とする形質転換細胞を得ることができる。

本発明における望ましい形質転換細胞は、細胞膜に LTC₄ 受容体を生物学的に活性化状態で発現する。したがってこの形質転換細胞に LTC₄ を作用させると、形質転換細胞には LTC₄ の刺激に対する応答が観察される。このような形質転換細胞は、後に述べる LTC₄ 受容体の結合活性を修飾する化合物のスクリーニングにも用いる

ことができる。

本発明による形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明の LTC₄ 受容体が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS 細胞であれば RPMI-1640 培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記 293-EBNA 細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

培養によって形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明の LTC₄ 受容体は、各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。分離・精製方法としては、例えば LTC₄ 受容体タンパク質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明の LTC₄ 受容体を表面に発現する細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより必要な膜分画を得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤（CHAPS、Triton X-100、ジキトニン等）で LTC₄ 受容体を可溶化することにより、可溶化後も受容体の特性を保持することができる。

本発明の LTC₄ 受容体はマーカー配列とインフレームで融合して発現させることで、該 LTC₄ 受容体の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitope などがある。また、マーカー配列と LTC₄ 受容体の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンビンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配

列を挿入することにより、マーカ配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体と Hexa-Histidine tag とをトロンピン認識配列で連結した報告がある (Hayashi, M.K. and Haga, T. (1996) J. Biochem., 120, 1232-1238)

また、本発明は、配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する DNA に関する。本発明の DNA と「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明の DNA とハイブリダイズし、他の DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。このような DNA は、本発明の DNA を検出、単離するためのプローブとして、また、本発明の DNA を増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは 15bp~40bp の鎖長を有する。プライマーとして好ましい塩基配列を、配列番号：7 (フォワードプライマー) および配列番号：8 (リバースプライマー) に示した。また、プローブとして用いる場合には、本発明の DNA の少なくとも一部若しくは全部の配列 (またはその相補配列) を有し、少なくとも 15bp の鎖長の DNA が用いられる。

本発明に基づくプローブやプライマーは、機能障害と関連した LTC₄ 受容体遺伝子の変異型の検出に利用することができる。欠失および挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅 DNA を標識 LTC₄ 受容体ヌクレオチドとハイブリダイズさせることで同定できる。完全にマッチした配列とミスマッチの二重鎖とは RNアーゼ消化により、または融解温度の差異により区別できることが知られている。また DNA 配列の差異は、配列を比較すべき領域の塩基配列を決定することによって検出することができる。あるいは、ゲルに含まれる変性剤の有無による DNA 断片の電気泳動の移動度の変化により検出する方法も公知である (Myers, R. M. et al. (1985) Science. 230, 1242-1246)。

特定位置での配列変化はヌクレアーゼプロテクションアッセイ（例えば、RNアーゼおよびS 1プロテクション）または化学的開裂法によっても確認できる（Cotton et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401）。

本発明に基づいて、LTC₄受容体の塩基配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することができる。アレイ技法は公知で、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変異性を解析するために用いられている（Chee, M. et al. (1996) Science, .274, 610-613）。

さらに、被験者から得られたサンプルからのLTC₄受容体のレベルの異常な低下または増加を測定することにより、LTC₄受容体の過少発現、過剰発現または変化した発現により生ずる疾患またはその罹病性の診断に利用される。発現の低下または増加は、当業者で公知のポリヌクレオチド定量法のいずれか、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼプロテクション、ノーザンブロット、その他のハイブリダイゼーション法によりRNAレベルで測定することができる。

これらのDNAに基づく診断のための試料は、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から得ることができる。

また、「配列番号：1に記載のDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明のタンパク質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のDNA）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明によるアンチセンス DNA を用いて LTC₄ 受容体遺伝子をノックアウトすることにより、LTC₄ 受容体が関与する疾患の解明を進めることができる。

本発明の DNA またはアンチセンス DNA は、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo 法や in vivo 法などにより患者へ投与を行う。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の LTC₄ 受容体に反応する抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、は各種動物に該 LTC₄ 受容体やその断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明の LTC₄ 受容体をコードする遺伝子を導入したプラスミドを用いて DNA ワクチン法 (Raz, E. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523; Donnelly, J. J. et al. (1996) J. Infect. Dis., 173, 314-320) によっても得ることができる。

ポリクローナル抗体は、LTC₄ 受容体タンパク質またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁し、腹腔、皮下また静脈等に免疫して感作した動物、例えばウサギ、ラット、ヤギ、またはニワトリ等の血清または卵から製造される。このように製造された血清または卵から、常法のタンパク質単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。ポリクローナル抗体の分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。

モノクローナル抗体は、ケーラーとミルスタインの細胞融合法 (Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Nature, 256, 495-497) により当業者が容易に製造するこ

とが可能である。本発明の LTC₄ 受容体またはその断片をフロイント完全アジュバントなどの適当なアジュバントに乳濁した乳濁液を数週間おきにマウスの腹腔、皮下または静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損やチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを持つミエローマ細胞、例えば、マウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8.U1、を利用する。また、融合剤としてはポリエチレングリコールを利用する。さらにはハイブリドーマ作製における培地として、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、RPMI-1640 などの通常よく用いられているものに適宜 10~30%の牛胎児血清を加えて用いる。融合株は HAT 選択法により選択する。ハイブリドーマの培養上清を ELISA 法や免疫組織染色法などの周知の方法によってスクリーニングし、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択する。また、限界希釈法によって、サブクロニングを繰り返すことによりハイブリドーマの単クローン性を保証する。このようにして得られるハイブリドーマは培地中で 2~4 日間、あるいはプリスタンで前処理した BALB/c 系マウスの腹腔内で 10~20 日培養することで精製可能な量の抗体が産生される。あるいは、ハイブリドーマを前記のような培地中で培養することもできる。

腹水や培養上清中に産生されるモノクローナル抗体は、常法のタンパク質単離精製法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、プロテイン A アガロース等によるクロマトグラフィー法が挙げられる。また、モノクローナル抗体またはその一部分を含む抗体断片は、該抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母、または動物細胞に導入して生産させることもできる。

更には、本発明の LTC₄ 受容体に反応する抗体を、クラクソンらやゼベデらの方

法 (Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352, 624-628; Zebedee, S. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179) により single chain Fv や Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. et al. (1994) Nature, 368, 856-859) に免疫することでヒト抗体を得ることも可能である。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる (Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

本発明によるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体からは、常法により、ペプシン、パパイン等のタンパク質分解酵素によって消化を行い、引き続き常法のタンパク質単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、 Fab' 、あるいは Fv を得ることができる。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法、競合結合アッセイ、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

また、本発明のタンパク質に結合する抗体を、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。

本発明は、本発明のタンパク質を利用した、被験化合物の LTC_4 受容体活性を検出する方法、並びにこの検出方法に基づいて LTC_4 受容体活性を修飾する化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明の検出方法は、本発明のタンパク質と被験化合物とを接触させ、本発明のタンパク質の LTC_4 受容体活性の変化を測定する工程を含む。更にこの検出方法を利用して、 LTC_4 受容体活性を修飾する物質を選択することにより本発明のスクリーニング方法を実施することができる。「 LTC_4

受容体活性を修飾する」とは、単独で本発明の LTC₄ 受容体に結合し、シグナルを伝達すること、または LTC₄ と競合し、LTC₄ によるシグナル伝達を阻害することを言う。

本発明の検出方法において、LTC₄ 受容体活性の変化は、スクリーニングに用いる LTC₄ 受容体タンパク質の生理学的な特性に応じた活性の指標を測定することにより行われる。指標とする活性とは、たとえばリガンドとの結合活性であり、あるいはリガンドの結合によってもたらされる刺激に対する応答である。具体的には、以下に述べるような検出方法を示すことができる。また本発明によるスクリーニング方法のための被験化合物としては、例えば次のような化合物を用いることができるが、これらの化合物に限定されることなく、あらゆる化合物を被験化合物とすることができる。

ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物

ペプチド

LTC₄ 受容体に対する抗体

コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137) によって得られた化合物群

ファージ・ディスプレイ法 (Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群

微生物の培養上清

植物や海洋生物由来の天然成分

動物組織抽出物

あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチド

続いて、代表的なスクリーニング方法について具体的に説明する。

a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC₄ 受容体に結合する化合物は、リガンド結合アッセイ法によりスク

リーニングすることができる。まず LTC₄ 受容体タンパク質を発現させた細胞膜、あるいは LTC₄ 受容体タンパク質精製標品を調製する。緩衝液、イオン、pH のようなアッセイ条件を最適化したバッファー中で、LTC₄ 受容体タンパク質を発現させた細胞膜、あるいは LTC₄ 受容体タンパク質精製標品を、標識リガンドとともに被験化合物と共に一定時間インキュベーションする。標識リガンドには、例えば [³H] LTC₄ を用いることができる。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被験化合物存在下における標識リガンドの特異的結合の阻害を指標に、LTC₄ 受容体に拮抗する化合物をスクリーニングすることができる。

たとえば、実施例 4 記載のリガンド結合アッセイ条件下で、[³H] LTC₄ とともに被験化合物を一定時間インキュベーションしたときの IC₅₀ が 10 μM 以下の物質を、更に好ましくは IC₅₀ が 1 μM 以下の物質を選択することができる。

b) GTPγS 結合法を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC₄ 受容体の活性を修飾する化合物は、GTPγS 結合法によりスクリーニングすることが可能である (Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120-1127)。LTC₄ 受容体を発現させた細胞膜を 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM GDP 溶液中で、³⁵S で標識された GTPγS 400 pM と混合する。被験化合物存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合した GTPγS の放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被験化合物存在下における特異的な GTPγS 結合の上昇を指標に、該 LTC₄ 受容体のアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。また、被験薬存在下における、LTC₄ または LTD₄ による GTPγS 結合上昇の抑制を指標に LTC₄ 受容体のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

c) 細胞内 Ca²⁺ および cAMP 濃度の変動を利用したスクリーニング方法

本発明の LTC₄ 受容体の活性を修飾する化合物は、LTC₄ 受容体を発現させた細胞

の細胞内 Ca^{++} または cAMP 濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。 Ca^{++} 濃度の測定は fura2、fluo3 等を用い、また cAMP 濃度の測定は市販の cAMP 測定キット (Amersham 社等) を用いて測定できる。その他 Ca^{++} および cAMP 濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより、間接的に Ca^{++} および cAMP 濃度を測定することもできる。 LTC_4 受容体を発現させた細胞と受容体を発現させていない宿主細胞 (コントロール細胞) に被験化合物を一定時間作用させ、 Ca^{++} および cAMP 濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、 LTC_4 受容体を発現させた細胞特異的な Ca^{++} の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。また、被験化合物存在下における、 LTC_4 または LTD_4 による Ca^{++} の上昇および/または cAMP 濃度の上昇または低下の阻害作用を指標に該 LTC_4 受容体のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング方法において選択すべきアンタゴニスト活性を有する化合物とは、本発明の LTC_4 受容体に対してリガンドである LTC_4 または LTD_4 と競合し、かつ LTC_4 受容体に結合したときにシグナルの伝達を伴わない化合物と定義することができる。アンタゴニストの本発明による LTC_4 受容体に対する親和性は制限されないが、 IC_{50} が $10 \mu\text{M}$ 以下、特に $1 \mu\text{M}$ 以下の化合物が望ましい。本明細書においては、アンタゴニストは、遮断剤、あるいは拮抗剤と同義の用語として用いられる。

たとえば、実施例 5 記載の条件で、被験化合物を一定時間作用させ LTC_4 または LTD_4 による細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇の阻害を指標にその IC_{50} が $10 \mu\text{M}$ 以下の物質を、更に好ましくは IC_{50} が $1 \mu\text{M}$ 以下の物質をアンタゴニスト活性を有する物質として選択することができる。

これらのスクリーニングにより単離される LTC_4 受容体タンパク質の活性を修飾する化合物を主成分として、 LTC_4 受容体を標的とする医薬を得ることができる。

例えば実施例において選択された化合物 A (N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide) は、 $IC_{50}=1.2\mu M$ を有する、本発明の LTC_4 受容体タンパク質に対するアンタゴニストである。化合物 A は、 LTC_4 受容体と LTC_4 の結合を用量依存的に阻害する。更に化合物 A は、本発明の LTC_4 受容体タンパク質の細胞遊走活性や、冠動脈平滑筋細胞の LTC_4 に対する応答を用量依存的に阻害する。これらの事実から、本発明のスクリーニング方法によって、本発明の LTC_4 受容体タンパク質のアンタゴニストを選択できることが明らかである。本発明の LTC_4 受容体タンパク質のアンタゴニストは、 LTC_4 受容体を標的とする医薬として有用である。

本発明の LTC_4 受容体タンパク質の活性を修飾する化合物を有効成分とする医薬製剤は、有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望ましい。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80 等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。本発明による医薬の投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

例えば経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60 kg として）において、1 日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは 0.1 ~ 50 mg である。また非経口投与の場合、注射剤の形では 1 日につき 0.01 ~ 50 mg、好ましくは 0.01 ~ 10 mg である。

図面の簡単な説明

図 1 は、LTC₄ 受容体に対する [³H]- LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を示すグラフである。図中、縦軸はタンパク質 1 mg 当たりの [³H]- LTC₄ 結合量 (fmol) を、横軸は反応液中の [³H]- LTC₄ 濃度 nM を示す。

図 2 は、LTC₄ 受容体に対する [³H]- LTC₄ の特異的結合の Scatchard 分析の結果を示す。図中、縦軸は結合率（結合／フリー比）を、横軸はタンパク質 1 mg 当たりの [³H]- LTC₄ 結合量 (fmol) を示す。

図 3 は、細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇に対する LTC₄ の用量依存性の結果を示す。図中、縦軸は蛍光強度の最高値 (counts) を、横軸は反応液中の LTC₄ 濃度 (logM) を示す。

図 4 は、組織におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布をノーザンプロットハ

イブリダイゼーション法によって解析した結果を示す写真である。

図5は、心血管系におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布を PCR 法によって解析した結果を示す写真である。

図6は、LTC₄ 受容体発現 CHO 細胞の細胞遊走に対する LTC₄ の用量依存性の結果を示す。図中、縦軸は吸光度(595nm)を、横軸は反応液中の LTC₄ 濃度(-logM)を示す。

図7は、LTC₄ による細胞遊走に対する化合物Aの用量依存的阻害の結果を示す。図中、縦軸は化合物なしのコントロールにおける吸光度を100%としたときの吸光度(%)を、横軸は反応液中の化合物Aの濃度(μM)を示す。

図8は、LTC₄ による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca²⁺濃度の上昇に対する化合物Aの用量依存的阻害の結果を示す。図中、縦軸は蛍光強度を、横軸は時間を示す。また、細胞内 Ca²⁺濃度の変化のタイムコースの内容については矢印で示す。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1. オリゴキャップ法による cDNA ライブラリーの作製

ヒト胎盤組織 (PLACE1) より、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989) 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ dT セルロースで poly(A)+RNA を精製した。

poly(A)+RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]により cDNA ライブラリーを作成した。Oligo-cap linker (配列番号: 3) およびオリゴ dT プライマー (配列番号: 4) を用いて文献 [鈴木・菅野, タンパク質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)]の記載にしたがって BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処

- 27 -

理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' (配列番号: 5) と 3' (配列番号: 6) の PCR プライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) により 2 本鎖 cDNA に変換し、SfiI 切断した。次いで、DraIII で切断したベクター pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector) に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブラリーを作成した。これらより得たクローンのプラスミド DNA について、挿入 cDNA サイズが 1 kb 以下のクローンを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製) を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNA シーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製) で DNA 塩基配列を解析した。

実施例 2. シグナル配列をもつクローンの選択

5'-末端配列の中のすべての ATG コドンから予測される推定アミノ酸配列について、中井・金久が開発したタンパク質の局在性予測プログラム「PSORT」を用い、多くの分泌タンパク質のアミノ末端に特徴的なシグナルペプチドと予測される配列の有無を解析することにより、シグナル配列をもつと予測されるクローンを特異的に選別した。この選別により、分泌タンパク質、または膜タンパク質をコードしている可能性の高いクローンを選ぶことができる。5'-端配列データ (one pass sequencing) から ATGpr1 [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>] の最大値が 0.7 以上で、シグナル配列 (PSORT で解析) を持ち、かつ、5'-端配列データでの ORF が存在するものを選別した。

実施例 3. PSEC0146 の配列決定

実施例 2 で選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。決定された cDNA 配列から、推定アミノ酸配列を明らかにした。

(1) Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー (アロカ社販売) のマニュアルに従ってシーケンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した)、

(2) AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネステッドシーケンス [S. E. Devine and J. D. Boeke, Nucleic Acids Res., 22: 3765-3772, (1994)] (PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクローンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3) カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイデオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング (カスタム合成 DNA プライマーをもちい PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

これらの配列について、ATGpr と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。ほとんどのクローンが N-末端にシグナル配列をもつ分泌タンパク質、または膜タンパク質であると推定された。このように決定された全長 cDNA の一つを、PSEC0146 と名づけた。PSEC0146 の塩基配列を配列番号：1 に、この塩基配列によってコードされる推定アミノ酸配列を配列番号：2 に記載した。

実施例 4 . COS 細胞による LTC₄ 受容体の発現と LTC₄ との結合実験

以下の実験によって PSEC0146 がコードするタンパク質の LTC₄ 受容体活性を確認した。まずこの cDNA がコードするタンパク質を発現させるために、当該 cDNA

をヒト脾臓由来の poly(A)⁺ RNA (Clontech 社) を鋳型として RT-PCR により取得した。RT-PCR に必要なプライマーの塩基配列は、実施例 3 で決定した塩基配列情報をもとに設定した。

RT-PCR には、配列番号：7 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、配列番号：8 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた（それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある）。RT-PCR は Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社）を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C（10 秒）／58 °C（30 秒）／72 °C（2 分）のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS plasmid（Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322）を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer（Applied Biosystems 社）を用いて解析した。得られたプラスミドは、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の全長をコードする配列を含むことが確認された。このプラスミドを pEF-BOS-PSEC0146 とした。

175mm² 培養フラスコに COS-1 細胞を 2x10⁶ 細胞で播種して 36 時間培養後、50 μg の pEF-BOS-PSEC0146 または pEF-BOS（空ベクター）を FuGENE6（Boehringer Mannheim 社）を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、36 時間培養した細胞を回収、洗浄後、20 mM Tris.HCl（pH7.4）, 5 mM EDTA, に懸濁してポリトロンにてホモジェナイズした。超遠心後、50 mM HEPES（pH7.4）, 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, に懸濁し、これを膜画分とした。

膜画分 5 μg に [³H]- LTC₄（第一化学薬品）を最終濃度 0.5~14x10⁻⁹ M になるように加え、50 mM HEPES（pH7.4）, 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM L-Serine, 10 mM Borate, 2 mM L-Cystein, 2 mM L-Glycine, からなる溶液 250 μl 中で室温 1 時間インキュベーションし、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで膜画分への総結合量を測定した。さらに、前述の試験に最終濃度 2 μM

- 30 -

の LTC₄ (CAYMAN 社) を加えることで、膜画分への非特異的結合量を測定した。その結果、[³H]- LTC₄ は pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分の特異的に結合することが分かった。pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分への [³H]- LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を図 1 に示した。また、この結合の Scatchard 分析の結果を図 2 に示した。Scatchard 分析の結果から、pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に対する LTC₄ の結合の解離定数は K_d=2.20 nM で、最大結合は B_{max}=10.4 pmol/mg protein であった。一方、空ベクターを遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分では特異的結合は観察されなかった。

以上のように、本発明の LTC₄ 受容体は、これまでその存在が示唆されながら実体が不明であった LTC₄ に強い親和性を持つ受容体であることが確認された。本 LTC₄ 受容体で形質転換した細胞を用いることで初めて結合実験および拮抗薬のスクリーニングが可能となった。

実施例 5 . HEK293-EBNA 細胞による LTC₄ 受容体の発現と LTC₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化

96well Black/clear bottom plate, collagen type I coated (BECTON DICKINSON 社製) に HEK293-EBNA 細胞を 1 ウェルあたり 2.5x10⁴ 細胞で播種して 24 時間培養後、1 ウェルあたり 40 ng の pEF-BOS-PSEC0146 または pEF-BOS (空ベクター) を FuGENE6 (Boeringer Mannheim 社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後、培地を廃棄し、4 μM Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid および 10% FBS を含む DMEM を 1 ウェルあたり 100 μl 添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を 20mM HEPES を含む Hanks BSS (GIBCO 社製) で 4 回洗浄して、1 ウェルあたり 100 μl の 20mM HEPES を含む Hanks BSS を添加した。細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は FLIPR (Molecular Device 社製) を用いて経時的に測定した。すなわち、測定開始 10 秒後に LTC₄ を最終濃度 2x10⁻⁶

- 31 -

M から 1×10^{-12} M になるように添加し、添加後、50秒間は1秒ごとに、さらに4分間は6秒ごとに蛍光強度を測定した。pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞は LTC₄ の用量依存的な細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が観察された。一方、空ベクターを遺伝子導入した細胞では LTC₄ による細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化は観察されなかった。結果を図3に示した。図3は、pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞の細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化データの蛍光強度の最高値を縦軸に、LTC₄ の濃度を横軸にプロットしたものである。pEF-BOS-PSEC0146 を遺伝子導入した細胞の LTC₄ による細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀ = 3.46 nM であることがわかった。また同様に LTD₄ による細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した結果、LTD₄ の EC₅₀ = 3.68 nM であることがわかった。以上のように、本 LTC₄ 受容体で形質転換した細胞は LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を誘導することが確認された。細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を測定することで、被験化合物の LTC₄ 受容体活性を修飾する活性を検出することができる。更に、この検出方法に基づいて LTC₄ 受容体活性を低下させる化合物を選択することによって、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングが可能となった。

実施例6. LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の構築

ヒト LTC₄ 受容体を発現させるための発現ベクターとして pEF-BOS-dhfr-PSEC0146 を用いた。10cm シャーレに CHO-dhfr(-) 株を 1×10^6 細胞で α MEM (核酸存在) 培地を用いて播種し1日培養後、8 μ g の pEF-BOS-dhfr-PSEC0146 を FuGENE6 (Boeringer Mannheim 社製) を用いて遺伝子導入した。24時間後、遺伝子導入した細胞を回収し、 α MEM (核酸非存在) 培地/100 nM Methotrexate (和光純薬社製) に懸濁後、段階希釈して10cm シャーレに播き直した。2週間後に出現したコロニーを個別に取得し、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞とした。

LTC₄ との結合実験のために LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を培養後、細胞を回収、

洗浄し、20 mM Tris.HCl (pH7.4) , 5 mM EDTA に懸濁してポリトロンにてホモジェナイズした。超遠心後、50 mM HEPES (pH7.4) , 40 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, に懸濁し、これを膜画分とした。実施例 4 と同条件にて膜画分 15 μg に対して [3H]-LTC₄ の結合実験を行った。実施例 5 と同様に、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分への [3H]-LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を書いた。また、この結合の Scatchard 分析の結果から、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分に対する LTC₄ の結合の解離定数は $K_d=2.65$ nM で、最大結合は $B_{max}=6$ pmol/mg protein であった。

また、細胞内 Ca^{++} 濃度の変化の測定のために、96well Black/clear bottom plate (BECTON DICKINSON 社製) に LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^4 細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、4 μM Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1% FBS、20 mM HEPES、2.5 mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウェルあたり 100 μl 添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化は実施例 5 と同条件にて FLIPR を用いて測定した。LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca^{++} 濃度の変化について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の $EC_{50}=0.44$ nM、LTD₄ の $EC_{50}=0.59$ nM であることがわかった。

以上のように、本 LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞においても、COS 細胞や HEK293-EBNA 細胞に一過的に発現させたときと同様に、LTC₄ に強い親和性を持ち、LTC₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を誘導することが確認された。

実施例 7. 組織におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布

ノーザン ブロット ハイブリダイゼーション法によりヒト LTC₄ 受容体遺伝子の発現分布を解析した。ヒト LTC₄ 受容体遺伝子のプローブには cDNA 断片 (配列番号: 1 の第 947 番目から第 1626 番目) を用いた。ヒトの各臓器由来の poly A+ RNA (2 μg) をブロットしたメンブレン (Clontech 社製) とプローブのハイブリタ

- 33 -

イゼーションは 50% ホルムアミド、5x SSPE、10 x Denhardt's 溶液、2% SDS、100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で、42°C (22 時間) で行った。メンブレンは、最終的に 0.2 x SSC、0.1% SDS を含む溶液で 2 回 (65°C、20 分) 洗浄した。

ヒトの各臓器 (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球、胃、甲状腺、脊髄、リンパ節、気管、副腎、骨髄) についてノーザン解析を行ったところ、図 4 に示すように約 5kb の mRNA が心臓、胎盤、脾臓、末梢血白血球、副腎で強く検出された。脳、腎臓、前立腺、卵巣、脊髄、リンパ節でも若干シグナルが検出された。以上のことから、本 LTC₄ 受容体はペプチドロイコトリエンに起因する心臓血管障害、炎症やアレルギー症状への関与が予想された。

実施例 8. 心臓血管系におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布

PCR 法によりヒト LTC₄ 受容体遺伝子の心臓血管系における発現分布を解析した。

PCRにはヒトの心臓各部位 (左心房、右心房、左心室、右心室、動脈、静脈、心室中隔、心膜) 由来の一本鎖cDNA (BioChain社製) を鋳型として、配列番号: 9 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとして、また、配列番号: 10 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーを用いた。PCRはTaq DNA polymerase (宝酒造社製) を用い5% DMSO存在下で94 °C (30秒) / 50 °C (30秒) / 72 °C (1分) のサイクルを30回繰り返した。また、内部標準としては上記のヒトの各部位のcDNAを鋳型として、Human G3PDH Control Amplimer Set (Clontech社製) を用いて、同条件のPCRを行った。反応産物は1%アガロースゲルにて電気泳動して解析した。また、正常ヒト冠動脈内皮細胞、正常ヒト冠動脈平滑筋細胞、正常ヒト肺微小血管内皮細胞、正常ヒト成人皮膚微小血管内皮細胞、正常ヒト新生児皮膚微小血管内皮細胞、正常ヒト大動脈内皮細胞、正常ヒト肺動脈

- 34 -

内皮細胞、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Clonetics社製) から ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を精製した。各細胞由来の total RNA 5 μ g を DNase (Nippon Gene社製) を用い 37 °C で 15 分反応させた。DNase 処理した total RNA をスーパースク립トファーストストランドシステム (RT-PCR 用) (GIBCO社製) にて cDNA 変換した。この cDNA を鋳型として上記と同条件にて PCR を行った。その結果を図 5 に示した。LTC₄ 受容体の約 450bp の増幅産物は左心房、右心房、左心室、右心室および冠動脈平滑筋細胞で強く検出された。また、心室中隔、心膜、肺微小血管内皮細胞、成人皮膚微小血管内皮細胞、新生児皮膚微小血管内皮細胞、肺動脈内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞にも弱いシグナルが検出された。以上の結果からペプチドロイコトリエンの機能として知られている心収縮力や冠血流量の低下作用に本 LTC₄ 受容体が関与していることが予想された。

実施例 9. 血球細胞におけるヒト LTC₄ 受容体の遺伝子発現分布

健康人ボランティアよりヘパリン採血し、6% デキストラン / 生理食塩水を 1/3 量加えて室温にて 1 時間放置した。上清を取り、150 x g で 5 分遠心処理後、沈査を Hunk's Balanced Solt Solution (HBSS) に懸濁した。これを等量の Ficoll-Paque (Pharmacia 社) に重層し、400 x g で 30 分遠心処理を行った。中間層を単核球画分、沈査を多核白血球として分取した。多核白血球は、CD16 マイクロビーズ (第一化学薬品社製) を加え、磁器スタンドにて好中球画分と好酸球画分に分離した。単核球画分、好中球画分、好酸球画分のそれぞれは生理食塩水にて洗浄後、ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて total RNA を精製した。各分画由来の total RNA 5 μ g を DNase (Nippon Gene 社製) を用い 37 °C で 15 分反応させた。DNase 処理した total RNA をスーパースク립トファーストストランドシステム (RT-PCR 用) (GIBCO 社製) にて cDNA 変換した。

LTC₄受容体の発現分布は上記血球画分の cDNA を鋳型として、実施例 8 と同一の条件で PCR 解析を行った。LTC₄受容体の約 450bp の増幅産物は健常人 A、B とともに各血球画分で検出された。とりわけ好酸球でよく検出された。以上の結果から好酸球を起因とする疾患、例えば、喘息などのアレルギー疾患に本 LTC₄受容体に関与していることが予想された。

実施例 10. ヒト LTC₄受容体遺伝子の染色体の位置の決定

ヒト LTC₄受容体遺伝子の染色体の位置を決定するために、ヒト／ハムスターラジエーションハイブリッドパネル GeneBridge 4 panel (Sanger Center) および G3 panel (Stanford University) (Research Genetics 社製) を鋳型に、配列番号：11 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、また、配列番号：12 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして PCR を行った。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 58 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。パネル内の各ベクターに対して LTC₄受容体に特異的な約 600 bp の DNA 断片の増幅の有無をポジティブ、ネガティブとして、その結果をインターネットを介して <http://www.genome.wi.mit.edu>、および <http://www-shgc.stanford.edu/RH/index.html> にて解析した。その結果、本 LTC₄受容体遺伝子はクロモソーム 13q14 の染色体マーカーの D13S153(GeneBridge 4)と SHGC-12474 (G3) に最も近かった。この染色体位置はアトピー性の喘息とのリンケージ (Kimura, K., et al. (1999) Human Molecular Genetics 8, 1487-1490) が示されている。また、この染色体位置は B 細胞白血病患者で遺伝子の欠失が確認されている (Kalachikov, S., et al. (1997) Genomics 42, 369-377)。本 LTC₄受容体遺伝子の変異が上記の疾患と関連していることが予想された。

実施例 1 1. LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を用いた LTC₄ 受容体と LTC₄ の結合を阻害する化合物のスクリーニング

実施例 6 で作製した LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分を用いて LTC₄ の結合を阻害する活性を指標に候補化合物のスクリーニングを行った。実際には、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の膜画分 15 μ g を含む 50 mM HEPES (pH7.4), 40 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM L-Serine, 10 mM Borate, 2 mM L-Cystein, 2 mM L-Glycine, からなる溶液に一定濃度の候補化合物と 0.5x10⁻⁹ M の [³H]-LTC₄ を添加し、室温で 1 時間インキュベーションした後、セルハーベスターにてグラスフィルターに回収した。グラスフィルターにマイクロシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。また、同時に前述の試験において候補化合物を添加しないもの、最終濃度 1 μ M の LTC₄ を加えたものをそれぞれ総結合量、非特異的結合量として放射活性を測定した。このような条件で、IC₅₀ が 10 μ M 以下の化合物として、例えば、N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-6-(1-propyl-1H-benzimidazol-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide (化合物 A) が挙げられる。この化合物は LTC₄ 受容体と LTC₄ の結合を用量依存的に阻害し、その IC₅₀ は 1.2 μ M であった。なお化合物 A は以下の方法で製造した。

製造例 1

¹H NMR は内部標準としてテトラメチルシラン (δ ; 0.00ppm) を用いた。

製造例 1-1 2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾール

塩化メチレン (40ml) にフェニレンジアミン 2.335g を加え、さらに 2-塩化ナフトイル 4.105g を加えて室温にて一晩攪拌した。溶媒を留去し、無色固体 6.391g を得た。

この固体に 1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン 40ml を加えて 170°C で一晩攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残差をエーテルに溶解した後、飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した。エーテル層を硫酸マグネシウムで脱水後、溶媒を留去すると

- 37 -

褐色固体が約 6.5g 得られた。この祖生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）にて分離・精製すると、2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾールが 3.514g(67%)得られた。

GC MS; 244(M⁺)

製造例 1 - 2 2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾール

製造例 1 - 1 にて得られた 2-(2-ナフチル)ベンズイミダゾール 1.486g を N,N-ジメチルホルムアミド 20ml に溶解し、60%水素化ナトリウム 300mg を加えた。15 分攪拌後、ヨウ化プロピル 0.72ml を加え、1 時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去した後、1 規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、エーテルにて抽出した。エーテル層を硫酸マグネシウムで脱水後、溶媒を留去すると赤みを帯びた残差が得られた。この祖生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム-ヘキサン；1：1〜クロロホルムのみ）にて分離・精製すると無色固体の 2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾールが 1.195g(77%)得られた。

¹H NMR(90MHz, CDCl₃); 0.85(t, 3H), 1.74-1.99(m, 2H), 4.18-4.35(m, 2H), 7.25-8.21(m, 11H)

GC MS; 286(M⁺)

製造例 1 - 3 N-(3,4-ジメチル-5-イソキサゾリル)-6-(1-プロピルイミダゾール-2-イル)ナフタレンスルホンアミド

製造例 1 - 2 で得られた 2-(2-ナフチル)-1-プロピルベンズイミダゾール 1.601g をクロロホルム 4ml に溶解し、室温にてクロロ硫酸(1.2ml)クロロホルム溶液(2ml)を滴下した。滴下後、2 時間加熱還流し、放冷すると反応液が上層（クロロホルム層）と下層（生成物）に分離した。上層を分離し、下層をクロロホルムで洗浄すると、褐色油状物が得られた。

この化合物にプロピルアミン 3.2ml、クロロホルム 2ml を加え、5 分間加熱還

- 38 -

流した。放冷後、オキシ塩化リン 10ml を加え、さらに 30 分間加熱還流した。放冷後、反応液を氷水に注ぎ、クロロホルムにて抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水にて洗浄した後、硫酸マグネシウムにて脱水した。減圧下、溶媒を留去し、粗生成物を 2.703g 得た。

この化合物の塩化メチレン(5ml)溶液を、5-アミノ-3,4-ジメチルイソキサゾール 457mg をピリジン 2ml に溶解したものに加えた。一日攪拌後、クロロホルムを加え、0.1 規定塩酸、飽和食塩水にて洗浄した後、硫酸マグネシウムで脱水した。減圧下、溶媒を留去すると褐色泡状物が得られた。このものを中圧シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム-メタノール ; 100 : 1~10 : 1) にて分離し、得られた粗生成物をアセトン-ヘキサン-エーテルにて再結晶すると N-(3,4-ジメチル-5-イソキサゾリル)-6-(1-プロピルイミダゾール-2-イル)ナフタレンスルホンアミド 221mg(12%)が得られた。

^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6); 0.72(t, 3H), 1.72(q, 2H), 4.42(t, 2H), 7.29-7.38(m, 2H), 7.74-7.79(m, 3H), 8.14(q, 1H), 8.24(q, 1H), 8.48(d, 1H), 8.60(d, 1H), 8.76(d, 1H)

FAB MS; 461($M^+ + 1$)

実施例 12. LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を用いた LTC₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を阻害する化合物のスクリーニング

実施例 6 で作製した LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞を 96well Black/clear bottom plate に 1 ウェルあたり 2×10^4 細胞で播種して 24 時間培養後、培地を廃棄し、4 μM Fluo-3, AM(Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウェルあたり 100 μl 添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。一定濃度の候補化合物の添加 5 分後に、1nM LTC₄ を添加し、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例 6 と同条件にて FLIPR を

用いて測定した。例えば、実施例 1 1 で選択した化合物 A は LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の LTC₄ による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を用量依存的に抑制することから、LTC₄ 受容体のアンタゴニストであることが分かった。その IC₅₀ は 2.3 μM であった。またこの化合物 A は、LTC₄ 受容体安定発現 CHO 細胞の LTD₄ による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇も用量依存的に抑制した。

実施例 1 3 . LTC₄ 受容体発現 CHO 細胞の LTC₄ による細胞遊走と LTC₄ 受容体アンタゴニストによる阻害

8 μm ポア ポリカーボネート フレームフィルター (Neuroprobe 社製) を 10 μg/ml フィブロネクチン (旭テクノグラス社) /PBS にて 4 °C で一晩処理した。96 blind ウェルチャンバー (Neuroprobe 社製) の下層に 0~1 μM の LTC₄ を入れ、フィブロネクチン処理したフレームフィルターをセットし、LTC₄ 受容体発現 CHO 細胞と空ベクター導入 CHO 細胞を αMEM (核酸非存在) 培地 /0.1% BSA で懸濁後、2x10⁵ 細胞でチャンバー上層に播種した。37 °C CO₂ インキュベーターにて 4 時間培養後、フレームフィルターをメタノールにて固定し、Diff-Quik 染色キット (国際試薬株式会社) にて染色した。このフィルターの上層面 (細胞をのせた側) を拭き取り、風乾後、プレートリーダー (Molecular Devices 社) で 595 nm の吸光度を測定した。その結果を図 6 に示した。LTC₄ 受容体発現 CHO 細胞は LTC₄ によりフィルター下層へと遊走することが観察された。細胞遊走は、3 nM 濃度の LTC₄ に対して遊走活性が最大となり、さらに高濃度では遊走活性が抑制されるというベル型の走化性を示した。本 LTC₄ 受容体は細胞遊走を誘導する活性を有していることが確認された。上記細胞遊走系において、上層に一定濃度の実施例 1 1 で選択した化合物 A を添加し、下層に 3nM LTC₄ を添加して細胞遊走活性を測定した。その結果を図 7 に示した。この化合物は用量依存的に LTC₄ による細胞遊走を抑制することが分かった。ヘプチドロイコトリエンは好酸球や好中球 (Spada, C. S.,

et al. J. Leukoc. Biol. (1994) 55, 183-191、Folco, F., et al. Novel Inhibitor of Leukotrienes (1999) 83-100, Birkhauser Verlag, Basel)、また、血管内皮細胞 (Kanayasu, T. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1989) 159, 572-578) の細胞遊走を誘導することが知られている。実施例 8、9 で示すように本 LTC₄ 受容体は好酸球、好中球および血管内皮細胞に発現していることから、これらの細胞の細胞遊走を介して、炎症やアレルギー症状、例えば、喘息などの増悪化に関与していることが示唆された。以上のことから、本 LTC₄ 受容体アンタゴニストは細胞遊走を抑制することによる抗炎症作用を有すると考えられる。

実施例 14 . 冠動脈平滑筋細胞の LTC₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇と LTC₄ 受容体アンタゴニストによる阻害

実施例 8 で本 LTC₄ 受容体の発現を確認したヒト冠動脈平滑筋細胞を 96well Black/clear bottom plate に 1 ウェルあたり 4×10^4 細胞で播種して 24 時間培養し、細胞を洗浄後、SmBM 培地 (Clonetics 社製) と置換し、さらに 48 時間培養した。培地を廃棄し、4 μ M Fluo-3, AM (Molecular Probe 社製)、0.004% pluronic acid、1%FBS、20mM HEPES、2.5mM probenecid を含む Hanks BSS を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。LTC₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化は実施例 6 と同条件にて FLIPR を用いて測定した。0, 10^{-6} ~ 10^{-9} M について測定した結果、ヒト冠動脈平滑筋細胞は LTC₄ の用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。上記測定系において、一定濃度の実施例 11 で選択した化合物 A またはカルシウムチャンネルブロッカーである Nifedipine (フナコシ社製) で 5 分間前処理をし、LTC₄ による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化を測定した。その結果を図 8 に示した。この化合物は用量依存的に LTC₄ による冠動脈平滑筋細胞の細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を抑制することが確認された。血管平滑筋細胞における細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇が血管収縮を引き

起こすことはよく知られている (Bolton, T. B., et al. *Physiol. Rev.* (1979) 59, 606-718)。Nifedipine は血管平滑筋の細胞内への Ca^{++} の流入を抑制することにより血管拡張薬として狭心症や高血圧治療薬として利用されている (Silver, P. J., *Calcium Bolckers. Mechanisms of Action and Clinical Applications.* (1982) 37, Urban & Schwarzenberg, Baltimore)。実際に、上記の測定系において Nifedipine は細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を抑制した。以上のことから、本 LTC_4 受容体アンタゴニストは血管平滑筋細胞の細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇を抑制することによる血管拡張作用を有すると考えられる。

実施例 15. ブタ LTC_4 受容体遺伝子のクローニング

配列番号 1 で示した PSEC0146 遺伝子配列情報からデザインした配列番号: 13 で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号: 14 で示されるオリゴヌクレオチドの組み合わせ、および、配列番号: 15 で示されるオリゴヌクレオチドと配列番号: 16 で示されるオリゴヌクレオチドの組み合わせを用いて PCR 法によって cDNA を取得した。PCR はブタ骨格筋から ISOTISSUE (日本ジーン社製) にて取得したブタゲノム DNA を鋳型として Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98°C (10 秒) / 50°C (30 秒) / 72°C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、それぞれ約 1.0 kbp および 0.6kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR-blunt (Invitrogen 社製) にクローニングし、得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer を用いて解析した。解析結果をコンティグして明らかになった塩基配列を配列番号: 17 に示した。同配列は 1038 塩基のオープンリーディングフレームを持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (345 アミノ酸) を配列番号: 18 に示した。このアミノ酸配列はヒト LTC_4 受容体のアミノ酸配列と 77.7% の相同性を有していた。

実施例 16. ラット LTC₄ 受容体遺伝子のクローニング

配列番号 1 で示した PSEC0146 遺伝子配列を用いた Genbank に対する BLAST(Basic local alignment search tool) [S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)] 検索を行った結果、アクセッション番号 AI178926 のラット脾臓 cDNA 由来の EST(Expression Sequence Tags)が高いスコアでヒットした。この AI178926 の配列情報はラット LTC₄ 受容体遺伝子の一部の配列を示していることが予想されたので、この配列情報からデザインした配列番号：19 で示されるオリゴヌクレオチドをフォーワードプライマーとし、また、PSEC1046 の遺伝子配列からデザインした配列番号：20 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして PCR 法によって cDNA を取得した。PCR はラット脾臓 cDNA (Clontech 社製) を鋳型として、Pyrobest DNA polymerase を使い 5% DMSO 存在下で 98 °C (10 秒) / 55 °C (30 秒) / 72 °C (2 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR-blunt にクローニングし、得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer を用いて解析した。明らかになった塩基配列を配列番号：21 に示した。同配列は 930 塩基のオープンリーディングフレームを持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (309 アミノ酸) を配列番号：22 に示した。このアミノ酸配列はヒト LTC₄ 受容体のアミノ酸配列と 72.6% の相同性を有していた。

実施例 17. ブタ LTC₄ 受容体の発現と LTC₄ との結合実験および LTC₄、LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇

以下の実験によって実施例 15 で得たブタ LTC₄ 受容体 DNA がコードするタンパク質の LTC₄ 受容体活性を確認した。まずこの cDNA がコードするタンパク質を発

現させるために、当該 cDNA をブタゲノム DNA を鋳型として PCR により取得した。PCR に必要なプライマーの塩基配列は、実施例 15 で決定した塩基配列情報をもとに設定した。PCR には配列番号：23 で示されるオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとし、配列番号：24 で示されるオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして用いた（それぞれの 5' 末端には XbaI site が付加してある）。PCR は Pyrobest DNA polymerase を用い 5% DMSO 存在下で 98 °C（10 秒）／55 °C（30 秒）／72 °C（2 分）のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pEF-BOS を用いてクローニングした。このプラスミドを pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体とした。

実施例 4 と同条件にて pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分を調製し、膜画分 20 µg に対して [³H]-LTC₄ の結合実験を行った。pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分への [³H]-LTC₄ の特異的結合の飽和曲線を実施例 5 と同様に書いた。また、この結合の Scatchard 分析の結果から、pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した COS-1 細胞の膜画分に対する LTC₄ の結合の解離定数は $K_d = 2.89 \text{ nM}$ で、最大結合は $B_{\text{max}} = 0.25 \text{ pmol/mg protein}$ であった。

また、細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定を実施例 5 と同条件にて HEK293-EBNA 細胞を用いて行った。pEF-BOS-ブタ LTC₄ 受容体を遺伝子導入した HEK293-EBNA 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀ = 5.0 nM、LTD₄ の EC₅₀ = 3.3 nM であることがわかった。

以上のように、本ブタ LTC₄ 受容体は LTC₄ に強い親和性を持ち、LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。

実施例 18. ラット LTC₄ 受容体の発現と LTC₄、LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化

以下の実験によって実施例 16 で得たラット LTC₄ 受容体 DNA がコードするタンパク質の LTC₄ 受容体活性を確認した。実施例 16 で得たラット LTC₄ 受容体遺伝子が導入された pCR-blunt を XbaI で消化してラット LTC₄ 受容体 DNA を pEF-BOS に導入した。このプラスミドを pEF-BOS-ラット LTC₄ 受容体とした。

細胞内 Ca⁺⁺濃度の変化の測定を実施例 5 と同条件にて HEK293-EBNA 細胞を用いて行った。pEF-BOS-ラット LTC₄ 受容体を遺伝子導入した HEK293-EBNA 細胞の LTC₄ および LTD₄ による細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇について Logistic 回帰法により用量依存性を解析した。その結果、LTC₄ の EC₅₀=19 nM、LTD₄ の EC₅₀=7.7 nM であることがわかった。

以上のように、本ラット LTC₄ 受容体は LTC₄ および LTD₄ に反応して用量依存的に細胞内 Ca⁺⁺濃度の上昇を誘導することが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明によって提供される LTC₄ 受容体は、ヒトの LTC₄ に起因する疾患、例えば気管支炎や皮膚炎等の炎症性疾患、心筋梗塞等の心血管系の疾患、の予防及び／または治療剤としての該受容体作用薬の探索及び評価に有用である。本発明によって LTC₄ 受容体が精製されたタンパク質として、あるいは LTC₄ に応答する形質転換細胞として利用可能となり、LTC₄ 受容体のインビトロでの結合実験を可能とした。

インビトロでの結合実験は、他の LTC₄ 受容体として作用するタンパク質の影響の無い、理想的な試験環境を現実のものとする。そして本発明によって提供される LTC₄ 受容体を用いたスクリーニング方法によって、該受容体の関与する疾患に対する治療薬として有用な化合物を選択することができる。また、本発明の LTC₄

- 45 -

受容体をコードする DNA は LTC₄ 受容体の製造に利用されるのみならず、LTC₄ 受容体の変異や異常な発現変動に起因する疾患の診断に有用である。更に LTC₄ 受容体を認識する抗体は、LTC₄ 受容体作動薬、診断薬又はポリペプチドの分離精製の手段等に利用することができる。

請求の範囲

1. 配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載のアミノ酸配列、または配列番号：2、配列番号：18、および配列番号：22のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を含み、ロイコトリエンC4受容体活性を有するタンパク質。
2. 配列番号：1、配列番号：17、および配列番号：21のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ロイコトリエンC4受容体活性を有するタンパク質。
3. 請求項1、または請求項2に記載のタンパク質をコードするDNA。
4. 請求項3に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。
5. 請求項4に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項1または請求項2に記載のタンパク質を製造する方法。
6. 請求項1または請求項2に記載のタンパク質に対する抗体。
7. 次の工程を含む、被験化合物のロイコトリエンC4受容体活性を修飾する活性の検出方法。
 - a) ロイコトリエンC4受容体のリガンドの存在下で請求項1または2に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物とを接触させる工程、
 - b) ロイコトリエンC4受容体活性の変化を測定する工程
8. 次の工程を含むロイコトリエンC4受容体活性を修飾する物質のスクリーニング方法。
 - a) ロイコトリエンC4受容体のリガンドの存在下で請求項1または2に記載のタンパク質、またはこのタンパク質を発現する形質転換細胞と被験化合物

物とを接触させる工程、

b) ロイコトリエン C 4 受容体活性の変化を測定する工程

c) ロイコトリエン C 4 受容体活性を修飾する物質を選択する工程

9. 請求項 1、または請求項 2 に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む抗炎症用、または抗アレルギー用医薬組成物。

10. 請求項 1、または請求項 2 に記載のロイコトリエン C 4 受容体活性を有するタンパク質のアンタゴニストと製薬学的に許容される添加剤を含む血管拡張用医薬組成物。

図 1

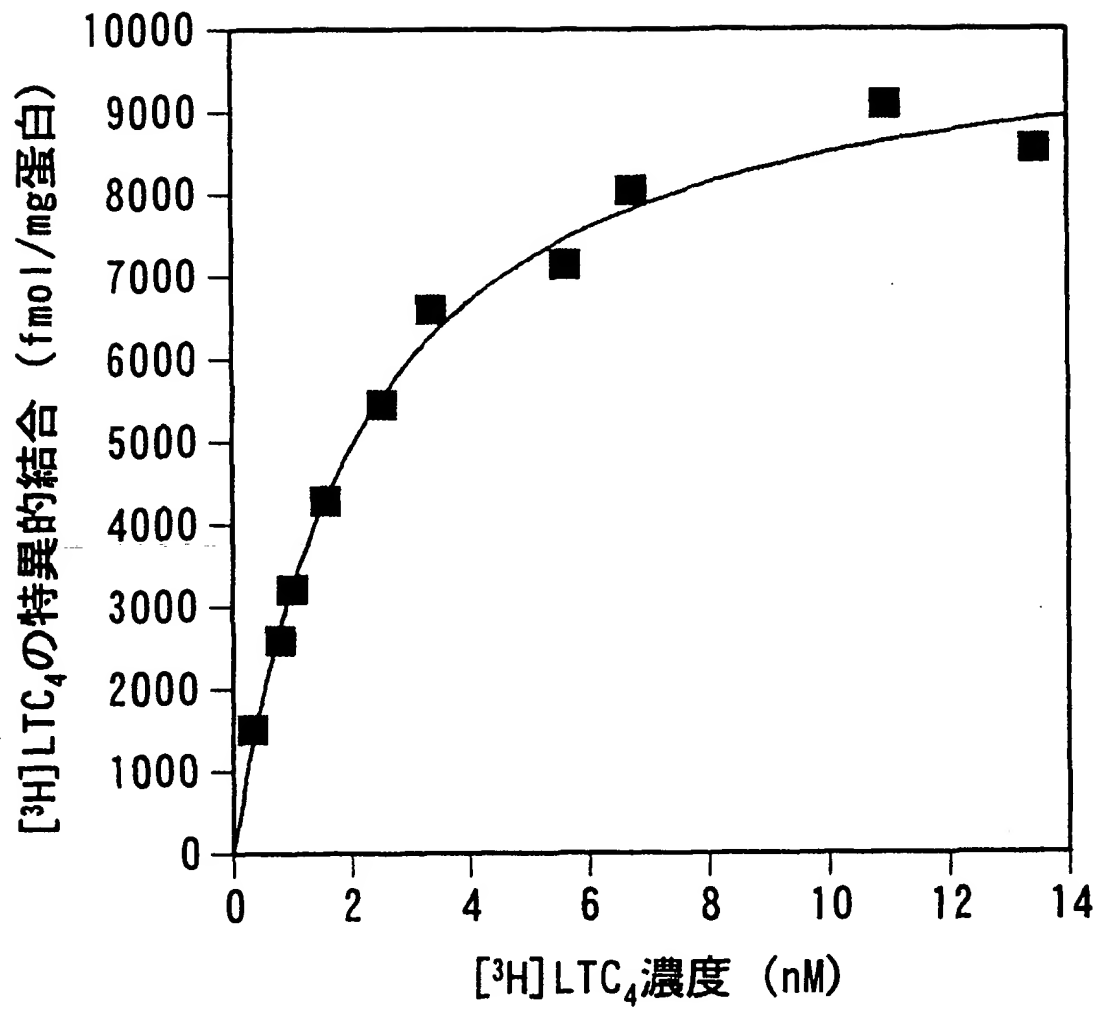


図 2

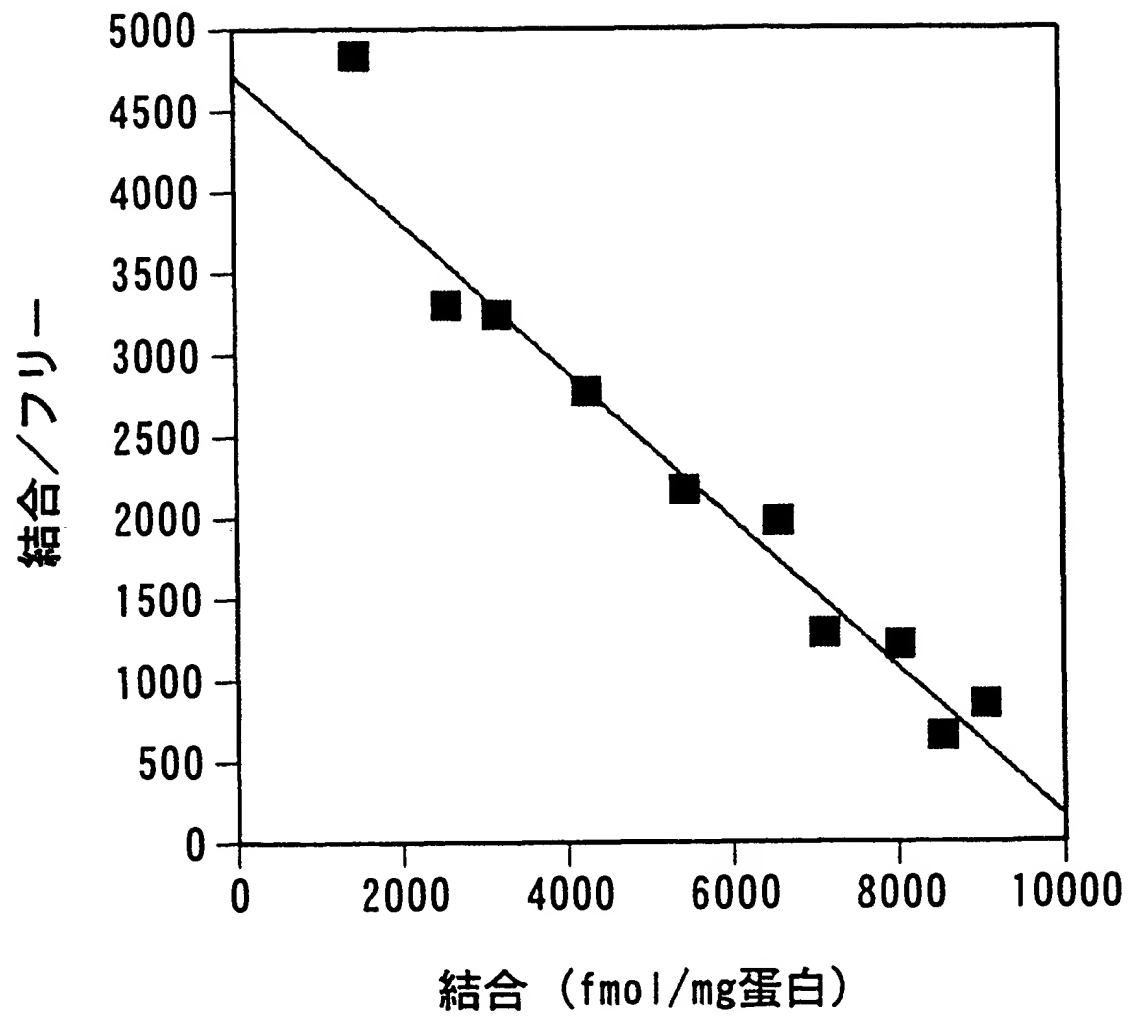


図 3

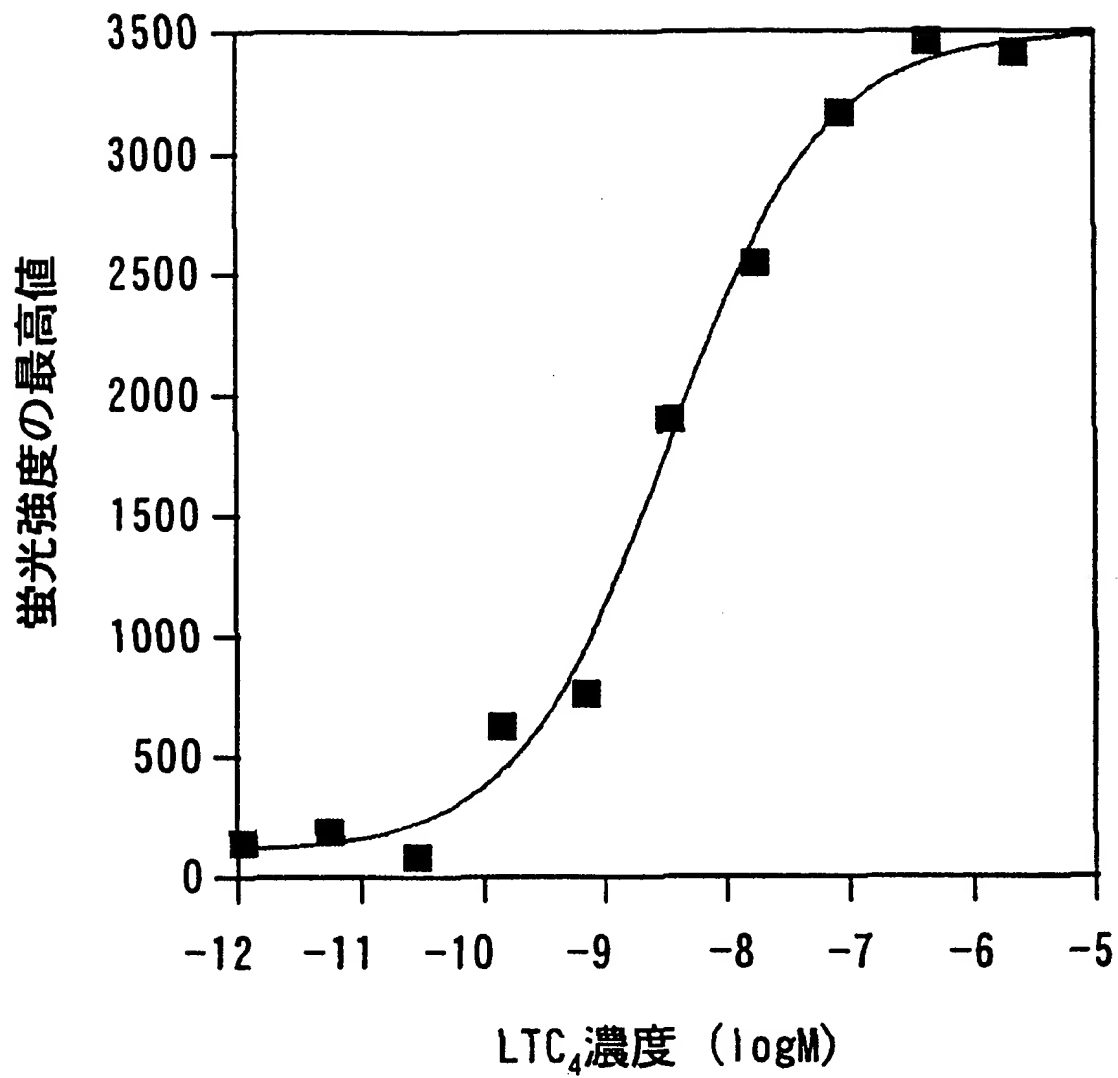


図 4

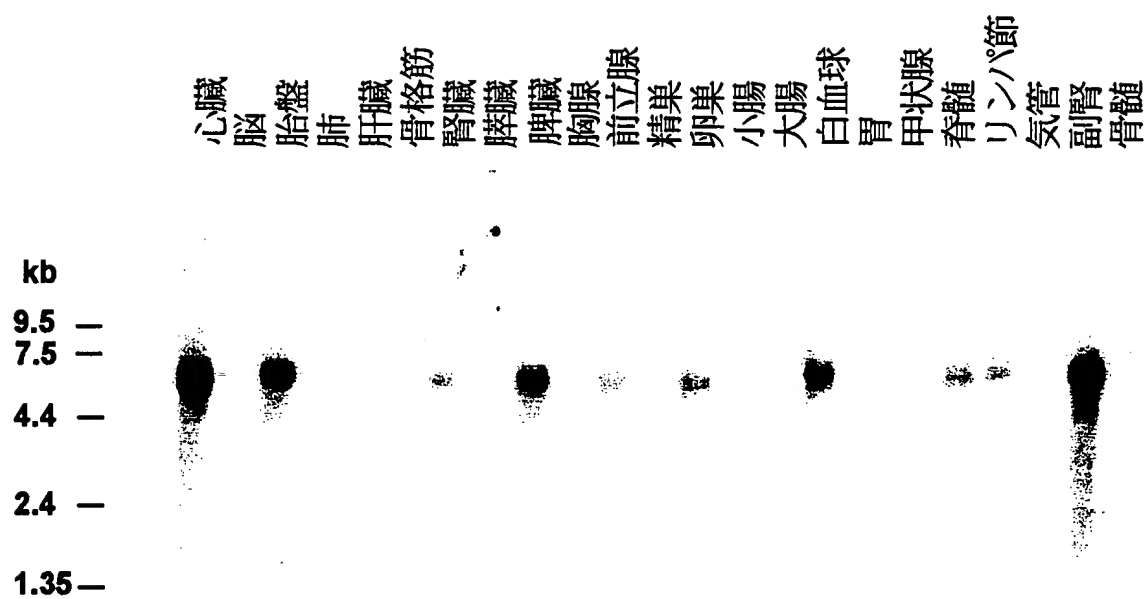
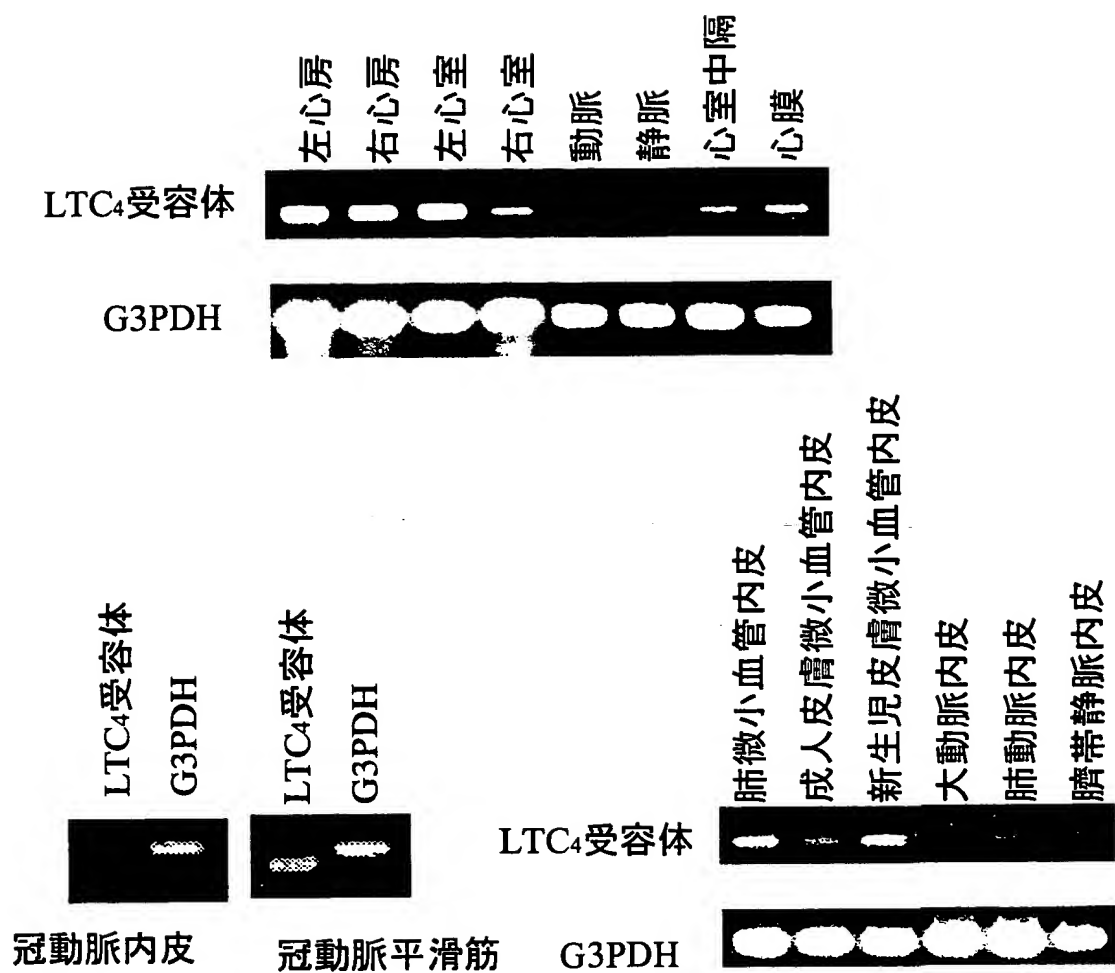
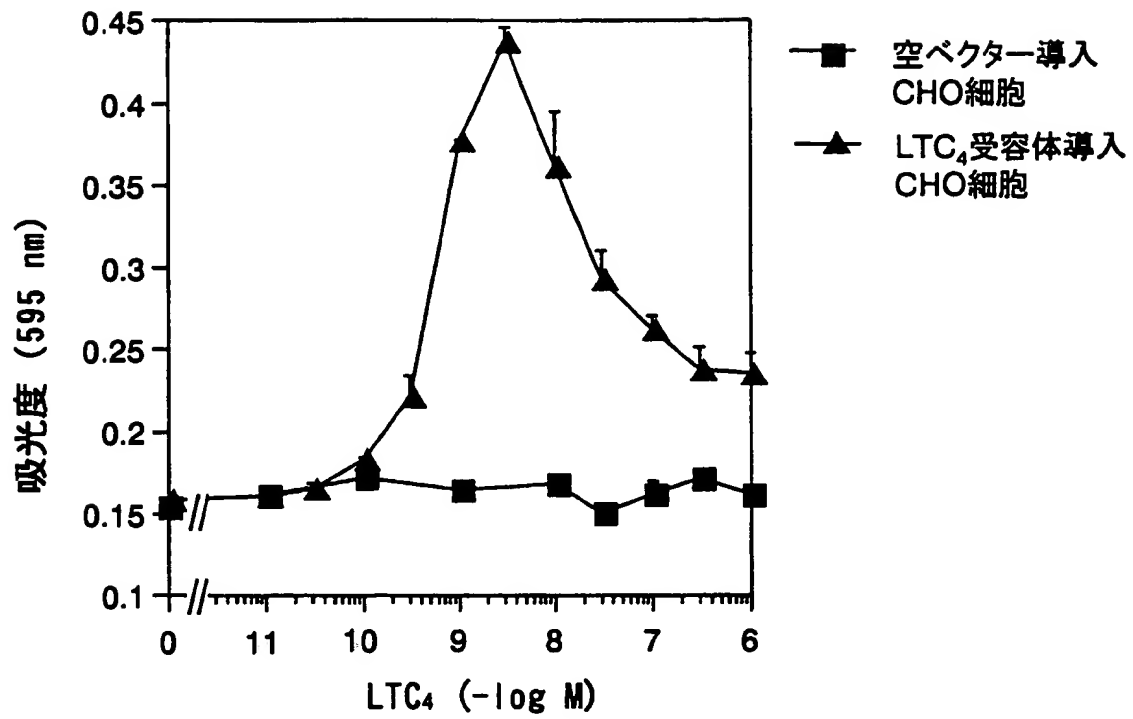


図 5



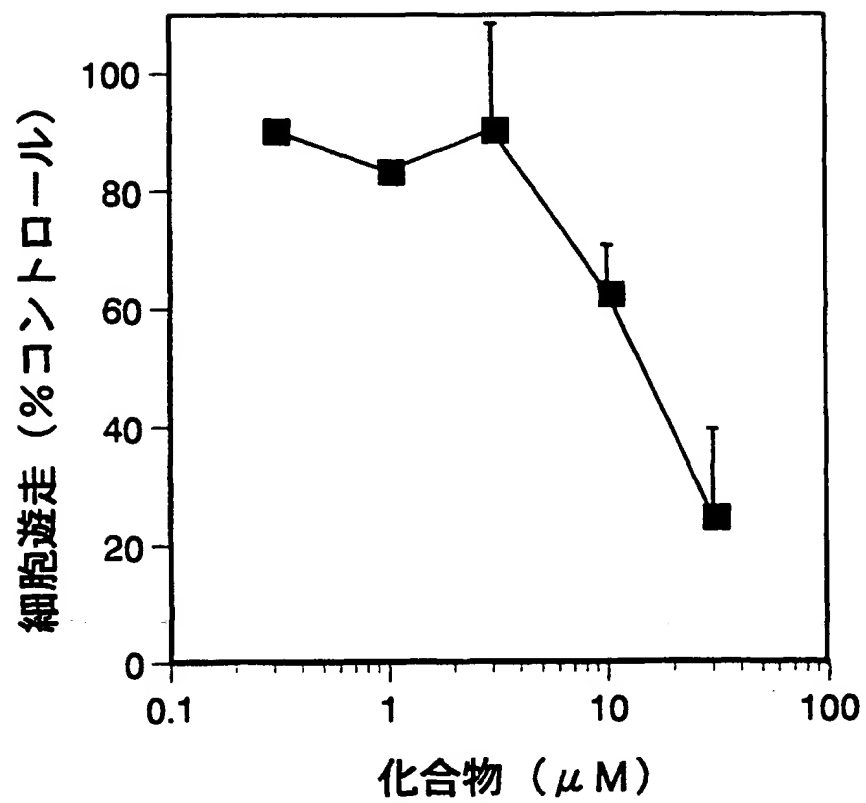
6/8

図 6



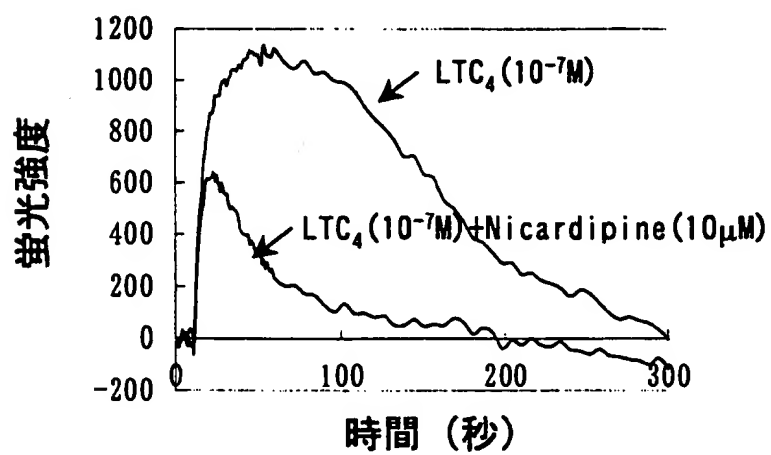
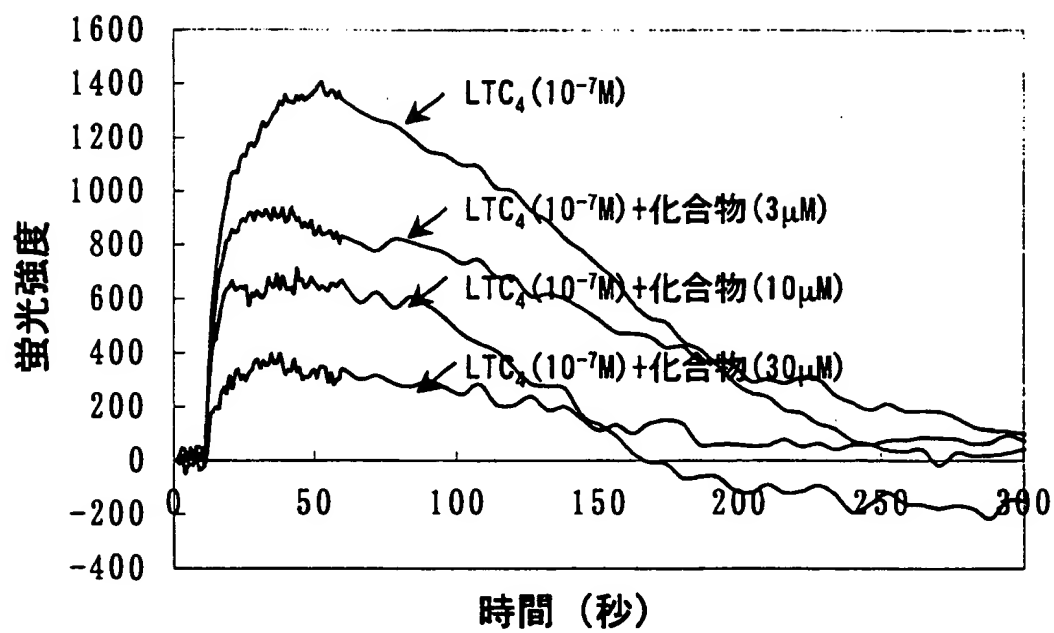
7/8

図 7



8/8

図 8



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

Helix Research Institute

<120> Peptide Leukotrien Receptor

<130> YH0022-PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-259986

<151> 1999-09-14

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (264)..(1301)

<400> 1

aagttctcta agtttgaagc gtcagcttca accaaacaaa ttaatggcta ttctacattc 60

aaaaatcagg aaatttaaat ttattatgaa atgtaatgca gcatgtagta aagacttaac 120

cagtgtttta aaactcaact ttcaaagaaa agatagtatt gctccctgtt tcattaaaac 180

ctagagagat gtaatcagta agcaagaagg aaaaaggga attcacaag taactttttg 240

2/23

tgtctgtttc tttttaaccc agc atg gag aga aaa ttt atg tcc ttg caa cca 293

Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gln Pro

1

5

10

tcc atc tcc gta tca gaa atg gaa cca aat ggc acc ttc agc aat aac 341

Ser Ile Ser Val Ser Glu Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn

15

20

25

aac agc agg aac tgc aca att gaa aac ttc aag aga gaa ttt ttc cca 389

Asn Ser Arg Asn Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro

30

35

40

att gta tat ctg ata ata ttt ttc tgg gga gtc ttg gga aat ggg ttg 437

Ile Val Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu

45

50

55

tcc ata tat gtt ttc ctg cag cct tat aag aag tcc aca tct gtg aac 485

Ser Ile Tyr Val Phe Leu Gln Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn

60

65

70

gtt ttc atg cta aat ctg gcc att tca gat ctc ctg ttc ata agc acg 533

Val Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr

75

80

85

90

ctt ccc ttc agg gct gac tat tat ctt aga ggc tcc aat tgg ata ttt 581

Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile Phe

95

100

105

gga gac ctg gcc tgc agg att atg tct tat tcc ttg tat gtc aac atg 629

Gly Asp Leu Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met

110

115

120

tac agc agt att tat ttc ctg acc gtg ctg agt gtt gtg cgt ttc ctg 677

Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu

125

130

135

3/23

gca atg gtt cac ccc ttt cgg ctt ctg cat gtc acc agc atc agg agt 725
 Ala Met Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Val Thr Ser Ile Arg Ser
 140 145 150

gcc tgg atc ctc tgt ggg atc ata tgg atc ctt atc atg gct tcc tca 773
 Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Ile Leu Ile Met Ala Ser Ser
 155 160 165 170

ata atg ctc ctg gac agt ggc tct gag cag aac ggc agt gtc aca tca 821
 Ile Met Leu Leu Asp Ser Gly Ser Glu Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser
 175 180 185

tgc tta gag ctg aat ctc tat aaa att gct aag ctg cag acc atg aac 869
 Cys Leu Glu Leu Asn Leu Tyr Lys Ile Ala Lys Leu Gln Thr Met Asn
 190 195 200

tat att gcc ttg gtg gtg ggc tgc ctg ctg cca ttt ttc aca ctc agc 917
 Tyr Ile Ala Leu Val Val Gly Cys Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser
 205 210 215

atc tgt tat ctg ctg atc att cgg gtt ctg tta aaa gtg gag gtc cca 965
 Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro
 220 225 230

gaa tcg ggg ctg cgg gtt tct cac agg aag gca ctg acc acc atc atc 1013
 Glu Ser Gly Leu Arg Val Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile
 235 240 245 250

atc acc ttg atc atc ttc ttc ttg tgt ttc ctg ccc tat cac aca ctg 1061
 Ile Thr Leu Ile Ile Phe Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu
 255 260 265

agg acc gtc cac ttg acg aca tgg aaa gtg ggt tta tgc aaa gac aga 1109
 Arg Thr Val His Leu Thr Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg
 270 275 280

4/23

ctg cat aaa gct ttg gtt atc aca ctg gcc ttg gca gca gcc aat gcc 1157
 Leu His Lys Ala Leu Val Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala
 285 290 295

tgc ttc aat cct ctg ctc tat tac ttt gct ggg gag aat ttt aag gac 1205
 Cys Phe Asn Pro Leu Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp
 300 305 310

aga cta aag tct gca ctc aga aaa ggc cat cca cag aag gca aag aca 1253
 Arg Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly His Pro Gln Lys Ala Lys Thr
 315 320 325 330

aag tgt gtt ttc cct gtt agt gtg tgg ttg aga aag gaa aca aga gta 1301
 Lys Cys Val Phe Pro Val Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Val
 335 340 345

taaggagctc ttagatgaga cctgttcttg tatccttgtg tccatcttca ttcactcata 1361

gtctccaaat gactttgtat ttacatcact cccaacaaat gttgattctt aatatttagt 1421

tgaccattac ttttgtaat aagacctact tcaaaaattt tattcagtgat attttcagtt 1481

gttgagtctt aatgagggat acaggaggaa aaatccctac tagagtcctg tgggctgaaa 1541

tatcagactg ggaaaaaatg caaagcacat tggatcctac ttttcttcag atattgaacc 1601

agatctcttg cccatcaggc tttctaaatt cttaaaaaga gccacaactt ccccagcttc 1661

tccagctccc ctgtcctctt caatcccttg agatatagca actaacgacg ctactggaag 1721

ccccagagca gaaaagaagc acatcctaag attcagggaag agactaactg tgaaaaggaa 1781

ggctgtccta taacaaagca gcatcaagtc ccaagtaagg acagtgagag aaaaggggga 1841

gaaggatttg agcaaaagag aactggcaat aagtagggga aggaagaatt tcattttgca 1901

5/23

ttgggagaga ggttctaaca cactgaaggc aaccctatct ctactgtttc tctcttgcca 1961
 gggatattagg aaggacagga aaagtaggag gaggatcttg gccattgccc taggaaatga 2021
 aagaattgtg tatagaatgg aagggggatc atcaaggaca tgtatctcaa attttctttg 2081
 agatgcaggt tagttgacct tgctgcagtt ctccctccca ttaattcatt gggatggaag 2141
 ccaaaaataa aagaggtgcc tctgaggatt agggttgagc actcaaggga aagatggagt 2201
 agagggcaaa tagcaaaagt tgttgcactc ctgaaattct attaacattt ccgcagaaga 2261
 tgagtaggga gatgctgcct tcccttttga gatagtgtag aaaaacacta gatagtgtga 2321
 gaggttcctt tctgtccatt gaaacaaggc taaggatact accaactact atcaccatga 2381
 ccattgtact gacaacaatt gaatgcagtc tccctgcagg gcagattatg ccaggcactt 2441
 tacatttggt gatcccatct gacattcaca ccaaagctct gaggttccatt ttacagctga 2501
 agaaattgaa gcttagagaa attaagaagc ttgtttaagt ttacacagct agtaagagtt 2561
 ttaaaaatct ctgtgcagaa gtgttggtg ggtgctctcc ccaccactac ctttgtaaac 2621
 ttccaggaag attggttgaa agtctgaata aaagctgtcc tttctacca atttcctccc 2681
 cctcctcact ctcaagaag aacaaaaagt ttctcttcag agttgttgac tcatagtaca 2741
 gtaaagggtg gaggtgatat gccattctga aagtagggag ggactaagtc agtcgtcata 2801
 ctaaac 2807

<210> 2

<211> 346

6/23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Arg Lys Phe Met Ser Leu Gln Pro Ser Ile Ser Val Ser Glu
1 5 10 15

Met Glu Pro Asn Gly Thr Phe Ser Asn Asn Asn Ser Arg Asn Cys Thr
20 25 30

Ile Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Phe Pro Ile Val Tyr Leu Ile Ile
35 40 45

Phe Phe Trp Gly Val Leu Gly Asn Gly Leu Ser Ile Tyr Val Phe Leu
50 55 60

Gln Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn Leu
65 70 75 80

Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Ile Ser Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp
85 90 95

Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Trp Ile Phe Gly Asp Leu Ala Cys Arg
100 105 110

Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr Phe
115 120 125

Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala Met Val His Pro Phe
130 135 140

Arg Leu Leu His Val Thr Ser Ile Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly
145 150 155 160

Ile Ile Trp Ile Leu Ile Met Ala Ser Ser Ile Met Leu Leu Asp Ser
165 170 175

7/23

Gly Ser Glu Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Cys Leu Glu Leu Asn Leu
180 185 190

Tyr Lys Ile Ala Lys Leu Gln Thr Met Asn Tyr Ile Ala Leu Val Val
195 200 205

Gly Cys Leu Leu Pro Phe Phe Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu Ile
210 215 220

Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg Val
225 230 235 240

Ser His Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Ile Ile Thr Leu Ile Ile Phe
245 250 255

Phe Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Thr Leu Arg Thr Val His Leu Thr
260 265 270

Thr Trp Lys Val Gly Leu Cys Lys Asp Arg Leu His Lys Ala Leu Val
275 280 285

Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Cys Phe Asn Pro Leu Leu
290 295 300

Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg Leu Lys Ser Ala Leu
305 310 315 320

Arg Lys Gly His Pro Gln Lys Ala Lys Thr Lys Cys Val Phe Pro Val
325 330 335

Ser Val Trp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Val
340 345

8/23

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized oligo-cap linker sequence

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized oligo (dT) primer sequence

<400> 4

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt ttttttttt tt

42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

9/23

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

gggtctagaa tggagagaaa atttatgtcc ttgc

34

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

10/23

synthesized primer sequence

<400> 8

gggtctagac tattatactc ttgtttcctt tctcaaccac

40

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

tggatcctct gtgggatcat atgg

24

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

aattctcccc agcaaagtaa tagag

25

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

11/23

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

gttaaaagtg gaggtcccag aatcggggct

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

agaaagcctg atgggccaga gatctggttc

30

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

cacaaagtaa ctttttgtgt ctgtttc

27

<210> 14

12/23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

ttctccccag caaagtaata gag

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

tggatcctct gtgggatcat atgg

24

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

aacaggtctc atctaag

17

13/23

<210> 17

<211> 1101

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (14).. (1048)

<400> 17

tttttaattc agc atg gag aga aaa ctt atg tcc tta ctt cca tcc atc 49

Met Glu Arg Lys Leu Met Ser Leu Leu Pro Ser Ile

1 5 10

tcc cta tca gaa atg gaa ccc aat agt acc ttg ggc aat cac aat agc 97

Ser Leu Ser Glu Met Glu Pro Asn Ser Thr Leu Gly Asn His Asn Ser

15 20 25

aac agg agc tgc acc aca gaa aac ttc aag aga gaa ttt tac ccc att 145

Asn Arg Ser Cys Thr Thr Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Tyr Pro Ile

30 35 40

gtg tac cta gta ata ttt atc tgg gga gcc ttg gga aat ggc ttt tct 193

Val Tyr Leu Val Ile Phe Ile Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser

45 50 55 60

ata tat gtt ttc ctg aaa cct tat aag aag tcc aca tca gtc aat gtt 241

Ile Tyr Val Phe Leu Lys Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val

65 70 75

ttc atg cta aat ctg gcc att tcg gat ctc tta ttc aca atc aca ctg 289

Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Thr Ile Thr Leu

80 85 90

14/23

ccc ttc agg gtt gac tat tac ctt aga ggc tcc aac ygg ata ttt ggg 337
 Pro Phe Arg Val Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Xaa Ile Phe Gly
 95 100 105

gac aca cct tgc agg att atg tct tat tct atg tat gtc aac atg tac 385
 Asp Thr Pro Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Met Tyr Val Asn Met Tyr
 110 115 120

agc agc att tat ttc ctg act gtg ctg agt gtt gtg cgt ttc ctg gca 433
 Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala
 125 130 135 140

act gtt cac ccc ttc cgg ctc ctt cat acc acc agc atc aag aac gcc 481
 Thr Val His Pro Phe Arg Leu Leu His Thr Thr Ser Ile Lys Asn Ala
 145 150 155

tgg att ctc tgt ggg gtc ata tgg atc ttt att atg gct tcc tca aca 529
 Trp Ile Leu Cys Gly Val Ile Trp Ile Phe Ile Met Ala Ser Ser Thr
 160 165 170

gta ctt ctg aag aat ggc tct gag cag aaa gac aat gtc aca ttg tgc 577
 Val Leu Leu Lys Asn Gly Ser Glu Gln Lys Asp Asn Val Thr Leu Cys
 175 180 185

tta gag ctg aat tct aat aaa gtt act aaa ctg aag acc atg aac tac 625
 Leu Glu Leu Asn Ser Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys Thr Met Asn Tyr
 190 195 200

gtt gcc ttg gtg gtg ggc ttt gtg ctg cca ttc ggc act ctc agc atc 673
 Val Ala Leu Val Val Gly Phe Val Leu Pro Phe Gly Thr Leu Ser Ile
 205 210 215 220

tgc tac ctg cta atc att cga gct ttg tta aag gta gag gtc ccg gag 721
 Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Ala Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu
 225 230 235

15/23

tcc ggg ctg cgg ctt tct cac agg aag gca ttg atc acc gtc atc att 769
 Ser Gly Leu Arg Leu Ser His Arg Lys Ala Leu Ile Thr Val Ile Ile
 240 245 250

gct ttg atc atc ttt ctc ctg tgt ttc ctg ccc tat cac gta ctg aga 817
 Ala Leu Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Arg
 255 260 265

acc ctt cac ctg ctc gaa tgg aaa gct gat aaa tgc aaa gac agg ctg 865
 Thr Leu His Leu Leu Glu Trp Lys Ala Asp Lys Cys Lys Asp Arg Leu
 270 275 280

cat aaa gct gtg gct gtc aca cta gct ttg gca gcg gcc aac agc tgc 913
 His Lys Ala Val Ala Val Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ser Cys
 285 290 295 300

ttc aat cct ttc ctc tat tac ttt gct ggg gag aat ttt aag gac aga 961
 Phe Asn Pro Phe Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg
 305 310 315

cta aag tct gca ctc agg aaa ggt cga cca cag aaa aca agg tgc ggt 1009
 Leu Lys Ser Ala Leu Arg Lys Gly Arg Pro Gln Lys Thr Arg Cys Gly
 320 325 330

ttc tct gtc tgt gtg tgg ctg aaa aag gaa acg aga gtg taagggatta 1058
 Phe Ser Val Cys Val Trp Leu Lys Lys Glu Thr Arg Val
 335 340 345

ttaggtgagg ctgttattat gtccttgccc ttgtgtctac ccc 1101

<210> 18

<211> 345

<212> PRT

<213> Sus scrofa

16/23

<400> 18

Met Glu Arg Lys Leu Met Ser Leu Leu Pro Ser Ile Ser Leu Ser Glu
 1 5 10 15

Met Glu Pro Asn Ser Thr Leu Gly Asn His Asn Ser Asn Arg Ser Cys
 20 25 30

Thr Thr Glu Asn Phe Lys Arg Glu Phe Tyr Pro Ile Val Tyr Leu Val
 35 40 45

Ile Phe Ile Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser Ile Tyr Val Phe
 50 55 60

Leu Lys Pro Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Thr Ile Thr Leu Pro Phe Arg Val
 85 90 95

Asp Tyr Tyr Leu Arg Gly Ser Asn Xaa Ile Phe Gly Asp Thr Pro Cys
 100 105 110

Arg Ile Met Ser Tyr Ser Met Tyr Val Asn Met Tyr Ser Ser Ile Tyr
 115 120 125

Phe Leu Thr Val Leu Ser Val Val Arg Phe Leu Ala Thr Val His Pro
 130 135 140

Phe Arg Leu Leu His Thr Thr Ser Ile Lys Asn Ala Trp Ile Leu Cys
 145 150 155 160

Gly Val Ile Trp Ile Phe Ile Met Ala Ser Ser Thr Val Leu Leu Lys
 165 170 175

Asn Gly Ser Glu Gln Lys Asp Asn Val Thr Leu Cys Leu Glu Leu Asn
 180 185 190

17/23

Ser Asn Lys Val Thr Lys Leu Lys Thr Met Asn Tyr Val Ala Leu Val
195 200 205

Val Gly Phe Val Leu Pro Phe Gly Thr Leu Ser Ile Cys Tyr Leu Leu
210 215 220

Ile Ile Arg Ala Leu Leu Lys Val Glu Val Pro Glu Ser Gly Leu Arg
225 230 235 240

Leu Ser His Arg Lys Ala Leu Ile Thr Val Ile Ile Ala Leu Ile Ile
245 250 255

Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Arg Thr Leu His Leu
260 265 270

Leu Glu Trp Lys Ala Asp Lys Cys Lys Asp Arg Leu His Lys Ala Val
275 280 285

Ala Val Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ser Cys Phe Asn Pro Phe
290 295 300

Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Asp Arg Leu Lys Ser Ala
305 310 315 320

Leu Arg Lys Gly Arg Pro Gln Lys Thr Arg Cys Gly Phe Ser Val Cys
325 330 335

Val Trp Leu Lys Lys Glu Thr Arg Val
340 345

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

18/23

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

atatgtctga tgcctgccaa

20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

agtcatttgg agactatgag tg

22

<210> 21

<211> 1249

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (208).. (1134)

<400> 21

atatgtctga tgcctgccaa ggtcagaaga ggggtgtcgga gaaacttgct tctcgccatg 60

tgagatggag tacggcaaat gtttgatcac taatcaggaa gaaaagtgga attgtatgaa 120

19/23

gtaacttttt gggttttttt ctttttaaac taatataaag agaaaacttt atattagtcc 180

ttgcctctgt ccaactccat attagaa atg gga gta act ggg acc ccc agc tat 234

Met Gly Val Thr Gly Thr Pro Ser Tyr

1

5

tat agt gac aag aac tgt aca ata gaa aac ttc aag agg gac ttt tac 282

Tyr Ser Asp Lys Asn Cys Thr Ile Glu Asn Phe Lys Arg Asp Phe Tyr

10

15

20

25

cct atc atc tac ctg ata ata ttt gtc tgg gga gcc ttg gga aat ggc 330

Pro Ile Ile Tyr Leu Ile Ile Phe Val Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly

30

35

40

ttt tcc ata tat gtc ttc cta cag act tac aag aag tcc aca tct gtg 378

Phe Ser Ile Tyr Val Phe Leu Gln Thr Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val

45

50

55

aat gtt ttc atg ctc aac ctg gcc att tca gat ttc cta ttc ata agc 426

Asn Val Phe Met Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Phe Ile Ser

60

65

70

acc ctg ccc ttc agg gct gac tat aat ttc aga ggt tct gat tgg ata 474

Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp Tyr Asn Phe Arg Gly Ser Asp Trp Ile

75

80

85

ttt ggg gac tgg gcc tgc aga att atg tct tat tct tta tat gtc aac 522

Phe Gly Asp Trp Ala Cys Arg Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn

90

95

100

105

atg tat act agc att tat ttc cta act gtg ctg agt att gtg cgc ttc 570

Met Tyr Thr Ser Ile Tyr Phe Leu Thr Val Leu Ser Ile Val Arg Phe

110

115

120

ctg gcc act gcc cac ccc ttc cag atg ctc cat atc acc agc gtt agg 618

20/23

Leu Ala Thr Ala His Pro Phe Gln Met Leu His Ile Thr Ser Val Arg
 125 130 135

agt gcc tgg atc ctc tgt ggg att ata tgg gtc ttc atc atg gct tcc 666
 Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly Ile Ile Trp Val Phe Ile Met Ala Ser
 140 145 150

tca gga ctg ctt ctg aag cat ggc caa gag aag aaa aat aac act aca 714
 Ser Gly Leu Leu Leu Lys His Gly Gln Glu Lys Lys Asn Asn Thr Thr
 155 160 165

ttg tgc ttt gag ctg aat ctc caa aag ttt aaa aat ctc gtc atc ttg 762
 Leu Cys Phe Glu Leu Asn Leu Gln Lys Phe Lys Asn Leu Val Ile Leu
 170 175 180 185

aac tac att gca tta ggg gtg ggc ttc ttg ctt cca ttt ttc ata ctc 810
 Asn Tyr Ile Ala Leu Gly Val Gly Phe Leu Leu Pro Phe Phe Ile Leu
 190 195 200

acc atc tgc tac ctg ttg atc atc cgg gtc ttg tta aag gtg gag att 858
 Thr Ile Cys Tyr Leu Leu Ile Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Ile
 205 210 215

cca gaa tca ggt cca cgg gat gct cag agg aag gca ctg acc act atc 906
 Pro Glu Ser Gly Pro Arg Asp Ala Gln Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile
 220 225 230

gtc att gcc atg atc atc ttc ctc ctc tgt ttt ctg cca tac cat gca 954
 Val Ile Ala Met Ile Ile Phe Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Ala
 235 240 245

ctt cgg acc atc cac ttg gtc aca tgg gat gca gat tca tgt atg gat 1002
 Leu Arg Thr Ile His Leu Val Thr Trp Asp Ala Asp Ser Cys Met Asp
 250 255 260 265

gaa tta cat aag gcc acg gtc atc act ctg acc ttg gct gca gcc aac 1050

21/23

Glu Leu His Lys Ala Thr Val Ile Thr Leu Thr Leu Ala Ala Ala Asn
 270 275 280

agc tgc ttc aat ccc ttt ctc tat tat ttt gct gga gag aat ttc aaa 1098
 Ser Cys Phe Asn Pro Phe Leu Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys
 285 290 295

gca cga tta agg gct ata ttc agc aaa gat cat cta tagaaagcaa 1,144
 Ala Arg Leu Arg Ala Ile Phe Ser Lys Asp His Leu
 300 305

agtcaaagtg cagccttcct atttgtgtat tactgaagac cagagttaag agcataaggg 1204

gctgttcttg aggtacgctc atgaacactg gtgtccacct tcact 1249

<210> 22

<211> 309

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 22

Met Gly Val Thr Gly Thr Pro Ser Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Cys Thr
 1 5 10 15

Ile Glu Asn Phe Lys Arg Asp Phe Tyr Pro Ile Ile Tyr Leu Ile Ile
 20 25 30

Phe Val Trp Gly Ala Leu Gly Asn Gly Phe Ser Ile Tyr Val Phe Leu
 35 40 45

Gln Thr Tyr Lys Lys Ser Thr Ser Val Asn Val Phe Met Leu Asn Leu
 50 55 60

Ala Ile Ser Asp Phe Leu Phe Ile Ser Thr Leu Pro Phe Arg Ala Asp
 65 70 75 80

22/23

Tyr Asn Phe Arg Gly Ser Asp Trp Ile Phe Gly Asp Trp Ala Cys Arg
85 90 95

Ile Met Ser Tyr Ser Leu Tyr Val Asn Met Tyr Thr Ser Ile Tyr Phe
100 105 110

Leu Thr Val Leu Ser Ile Val Arg Phe Leu Ala Thr Ala His Pro Phe
115 120 125

Gln Met Leu His Ile Thr Ser Val Arg Ser Ala Trp Ile Leu Cys Gly
130 135 140

Ile Ile Trp Val Phe Ile Met Ala Ser Ser Gly Leu Leu Leu Lys His
145 150 155 160

Gly Gln Glu Lys Lys Asn Asn Thr Thr Leu Cys Phe Glu Leu Asn Leu
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asn Leu Val Ile Leu Asn Tyr Ile Ala Leu Gly Val
180 185 190

Gly Phe Leu Leu Pro Phe Phe Ile Leu Thr Ile Cys Tyr Leu Leu Ile
195 200 205

Ile Arg Val Leu Leu Lys Val Glu Ile Pro Glu Ser Gly Pro Arg Asp
210 215 220

Ala Gln Arg Lys Ala Leu Thr Thr Ile Val Ile Ala Met Ile Ile Phe
225 230 235 240

Leu Leu Cys Phe Leu Pro Tyr His Ala Leu Arg Thr Ile His Leu Val
245 250 255

Thr Trp Asp Ala Asp Ser Cys Met Asp Glu Leu His Lys Ala Thr Val
260 265 270

23/23

Ile Thr Leu Thr Leu Ala Ala Ala Asn Ser Cys Phe Asn Pro Phe Leu
275 280 285

Tyr Tyr Phe Ala Gly Glu Asn Phe Lys Ala Arg Leu Arg Ala Ile Phe
290 295 300

Ser Lys Asp His Leu
305

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

gggtctagaa tggagagaaa acttatgtcc ttacttc

37

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

ccctctagac tattacactc tcgtttcctt tttcagccac

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/Genbank/DBJ/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.274, No.2, (August 2000), Takasaki J., et al. "The molecular characterization and tissue distribution of the human cycteiny l leukotriene CysLT (2) receptor", pp.316-322	1-10
A	Nature, Vol.399, (June 1999), Kevin R. Lynch, et al., "Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor", pp.789-79	1-10
A	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.275, No.1, (October 1995), Prie S. et al., "Leukotriene C4 receptors on guinea pig tracheocytes", pp.312-318	1-10
A	Molecular Pharmacology, Vol.53, No.4, (April 1998), Valerie Capra et al., "Identification and Characterization of Two Cysteinyl-Leukotriene High Affinity Binding Sites with Receptor Characteristics in Human Lung Parenchyma", pp.750-758	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 October, 2000 (24.10.00)

Date of mailing of the international search report
07 November, 2000 (07.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/705, 16/28, C12P21/02,
C12Q1/02, A61K31/422, A61P43/00, 9/08, C07D413/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), EMBL/Genbank/DBJ/GenSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.274, No.2, (8月.2000), Takasaki J., et al. "The molecular characterization and tissue distribution of the human cycteinyll leukotriene CysLT(2) receptor", p.316-322	1-10
A	Nature, Vol.399, (6月.1999), Kevin R. Lynch, et al. "Characterization of the human cysteinyll leukotriene CysLT1 receptor", p.789-793	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願。

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 10. 00

国際調査報告の発送日

07.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

印.

4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol.275, No.1, (10月.1995), Prie S. et al. "Leukotriene C4 receptors on guinea pig tracheocytes", p.312-318	1-10
A	Molecular Pharmacology, Vol.53, No.4, (4月.1998), Valerie Capra et al. "Identification and Characterization of Two Cysteinyl-Leukotriene High Affinity Binding Sites with Receptor Characteristics in Human Lung Parenchyma", p.750-758	1-10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.